

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abteilung für Molekularpharmakologie

Messung und Beeinflußbarkeit durch Fremdsubstanzen
von Monooxygenase-, Epoxidhydratase- und
Glutathion-S-Transferase-Aktivitäten in
Reuber-Hepatomzellen unter Einbeziehung von tierexperi-
mentellen Glutathion-S-Transferase-Induktionsstudien

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich der Medizin vorgelegt von

Dirk H. Raphael
aus Dortmund

Mainz 1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552617_0011

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abteilung für Molekularpharmakologie

**Messung und Beeinflußbarkeit durch Fremdsubstanzen
von Monooxygenase-, Epoxidhydratase- und
Glutathion-S-Transferase-Aktivitäten in
Reuber-Hepatomzellen unter Einbeziehung von tierexperi-
mentellen Glutathion-S-Transferase-Induktionsstudien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich der Medizin vorgelegt von

Dirk H. Raphael
aus Dortmund

Mainz 1981



Dekan: Prof. Dr. K.-H. Bäßler

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Oesch

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Jähnchen

3. Gutachter: Prof. Dr. E. Muscholl

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 1981

Liste der verwendeten Abkürzungen

ANF	- α -Naphthoflavin (7,8-Benzoflavin)
BNF	- β -Naphthoflavin (5,6-Benzoflavin)
BP-4,5-diol	- trans-4,5-Dihydroxy-4,5-dihydro- benzo(a)pyren
BP-4,5-oxid	- Benzo(a)pyren-4,5-oxid
cpm	- Impulszahl pro Minute
DCNB	- 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol
DMSO	- Dimethylsulfoxid
DNCB	- 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
EH	- Epoxidhydratase
GSH	- Glutathion
GSHT	- Glutathion-S-Transferase
MC	- 3-Methylcholanthren
MEM	- Minimum Essential Medium
MO	- Monooxygenase
PB	- Phenobarbital
PBS	- phosphatgepufferte Salzlösung
PCN	- Pregnenolon-16 α -carbonitril
Pr.	- Protein
rpm	- Umdrehungen pro Minute
Tris	- Trishydroxymethylaminomethan
TSO	- Transstilbenoxid

INHALT

Kapitel		Seite
1.	<u>EINLEITUNG</u>	9
2.	<u>PROBLEMSTELLUNG</u>	14
3.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	15
3.1.	Material	15
3.2.	Geräte	16
3.3.	Zusammensetzung der Zellkultur- medien	17
3.4.	Selbst hergestellte Lösungen	18
3.5.	Tiere	18
3.6.	Methoden	20
3.6.1.	Kultivierung der Zellen	20
3.6.1.1.	Herkunft und Anzucht der ver- schiedensten Zelllinien	20
3.6.1.2.	Subkulturverfahren zur Vermehrung der Zellen	21
3.6.2.	Tierleberpräparation zur Ge- winnung von Mikrosomen und Zytosol	21
3.6.3.	Proteinbestimmung nach Lowry	22
3.6.4.	Enzymmessungen	23
3.6.4.1.	Messung der Epoxidhydratase- aktivität	23
3.6.4.2.	Messung der Glutathion-S-Trans- feraseaktivität mit Benzo(a)py- ren-4,5-oxid als Substrat	24
3.6.4.3.	Messung der Glutathion-S-Trans- feraseaktivität mit den Substra- ten 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	25

Kapitel		Seite
3.6.4.4.	Messung der Monooxygenase- aktivität in Reuber-Hepatomezellen	26
4.	<u>ERGEBNISSE</u>	28
4.1.	Verfeinerung und Überprüfung der Gültigkeit von Meßverfahren für die Epoxidhydratase-, Gluta- thion-S-Transferase- und Monooxy- genaseaktivitäten in Reuber-Hepa- tomzellkulturen	28
4.1.1.	Weiterentwicklung des Verfahrens zur Messung der Epoxidhydratase in Zellkulturen	28
4.1.1.1.	Verringerung des Blindwertes	29
4.1.1.2.	Abhängigkeit der Epoxidhydratase in Zellkulturhomogenaten von der Ultraschallbehandlung	30
4.1.1.3.	Nachweis der Validität des Meßver- fahrens der Epoxidhydratase in Reuber-Hepatomezellen	34
4.1.1.3.1.	Radiochromatogramm der Äthyl- acetatphase	34
4.1.1.3.2.	Präparation von trans-4,5-Di- hydroxy-4,5-dihydrobenzo(a)pyren	37
4.1.1.3.3.	Untersuchung auf eine Folgere- aktion des trans-4,5-Dihydroxy- 4,5-dihydrobenzo(a)pyrens unter den Reaktionsbedingungen der Epoxidhydratasebestimmung in Reuber-Hepatomezellkulturen	38
4.1.1.3.4.	Untersuchung der Epoxidhydra- taseaktivität in Homogenaten von Reuber-Hepatomezellen auf Lineari- tät mit Zeit und Protein	39

Kapitel		Seite
4.1.1.3.5.	Messung der wasserlöslichen Nebenprodukte bei der Inkubation von BP-4,5-oxid mit Homogenaten von Reuber-Hepatomzellen	41
4.1.1.4.	Die pH-Abhängigkeit der EH-Aktivität im Reuber-Hepatomzellhomogenat	44
4.2.	Messung der EH-Aktivität in verschiedenen Zellkulturlinien	46
4.3.	Tierexperimentelle Vorstudien zur Messung und Induktion der GSH-S-Transferaseaktivität	48
4.3.1.	Messung und Induktion der GSH-S-Transferaseaktivität mit BP-4,5-oxid als Substrat in verschiedenen Tierspezies	48
4.3.2.	Nachweis der Produkthemmung der GSH-S-Transferasereaktion durch das BP-4,5-oxid-GSH-Konjugat	57
4.3.2.1.	Herstellung von BP-4,5-oxid-GSH-Konjugat	57
4.3.2.2.	Messung der GSH-S-Transferaseaktivität mit BP-4,5-oxid als Substrat unter definierter Produktzugabe	60
4.3.3.	Induktion der zytosolischen und mikrosomalen GSH-S-Transferaseaktivität im Tierversuch	62
4.4.	Messung der GSH-S-Transferaseaktivität in Reuber-Hepatomzellen	66
4.4.1.	Bestimmung der GSH-S-Transferaseaktivität mit dem Substrat BP-4,5-oxid	66
4.4.1.1.	Abhängigkeit der GSH-S-Transferaseaktivität im 10 000 g-Überstand des	71

Kapitel		Seite
	Reuber-Hepatomzellhomogenates von der Vorinkubation des Reaktions- ansatzes bei 37°C	
4.4.2.	Messung der GSH-S-Transferase- aktivität mit den Substraten 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	71
4.4.2.1.	Nachweis einer mikrosomalen GSH- S-Transferaseaktivität in Reuber- Hepatomzellen	77
4.5.	Messung der Monooxygenaseaktivi- tät in Reuber-Hepatomzellen	79
4.6.	Induktionsstudien der MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatom- zellen	84
4.6.1.	Zellkulturbedingungen für die In- duktionsstudien	84
4.6.2.	Testung einer Reihe ausgesuchter Substanzen auf die Induktion der MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber- Hepatomzellen	88
4.6.3.	Untersuchung der Wirkung von α - und β -Naphthoflavon auf die MO-, EH- und GSHT-Aktivität	96
4.6.4.	Induktionswirkung von struktur- isomeren karzinogenen und nicht karzinogenen Substanzen auf die MO-, EH- und GSHT-Aktivität	105
5.	<u>DISKUSSION</u>	119
5.1.	Enzymmessungen	119
5.1.1.	EH-Aktivitätsmessung in Zellkulturen	119
5.1.2.	Messung der GSHT-Aktivität	122

Kapitel		Seite
5.1.2.1.	Messung und Induktion der GSHT-aktivität im Tierexperiment	122
5.1.2.2.	Messung der GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen	124
5.1.3.	Messung der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen	126
5.2.	Beeinflussbarkeit der MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen durch Fremdsbstanzen	127
6.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	132
7.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	137
8.	<u>DANKSAGUNG</u>	145
9.	<u>LEBENS LAUF</u>	146

1.

EINLEITUNG

Der Schwerpunkt der medizinischen Grundlagenforschung war und ist auf die Ergründung der Ursachen und die Suche nach Behandlungsmöglichkeiten der Krankheiten gerichtet, die in der jeweiligen Epoche nach Häufigkeit, Art und Schwere ihres Auftretens die stärkste Bedrohung für die Menschheit darstellten. Nachdem durch gezielte Prävention und Therapie die großen Infektionskrankheiten weitgehend ihren Schrecken verloren hatten, rückten die bösartigen Tumoren, mit 20 % hinter den Herz- und Kreislauferkrankungen an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik in der Bundesrepublik Deutschland (1), in den Mittelpunkt des allgemeinen und wissenschaftlichen Interesses. Als auslösende Ursachen der Bildung maligner Geschwülste wurden in grundlegenden Arbeiten physikalische, chemische und biologische Noxen gefunden (2). Die überwiegende Mehrzahl der Autoren stellt die chemische Ätiologie als bedeutensten Faktor für die Krebsentstehung im Menschen heraus, der von Higginson (3) sogar auf 70 bis 90 % beziffert wird. Hieraus läßt sich die unbedingte Notwendigkeit ableiten, ein rationales Verständnis über die molekularen Mechanismen zu erarbeiten.

Epidemiologische Studien erbrachten die ersten Hinweise über Zusammenhänge zwischen der Exposition mit chemischen Agentien und der Bildung von bösartigen Tumoren. 1761 beobachtete John Hill die Entwicklung von Nasenkarzinomen als Folge von übermäßigem Schnupftabakgenuß (4). Percival Pott beschrieb 1775 (5) das gehäufte Auftreten von Skrotalhautgeschwülsten bei jungen Männern, die in ihrer Jugend unter schlechten hygienischen Umständen als Schornsteinfeger tätig gewesen waren, und 1895 veröffentlichte Rehn eine Studie über die weit überzufällige Blasenkrebserkrankung von Arbeitern einer Anilinfabrik (6). Durch wiederholtes Auftragen von Kohlen-

teer auf Kaninchenohren erzeugten im Jahre 1915 Yama-
giwa und Ichikawa (7) die ersten experimentellen Tumoren.
Zwei bedeutende Meilensteine in der Erforschung
der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe als chemische
Karzinogene waren die Entdeckung des Dibenz(a,h)anthra-
cens als erstes synthetisches Karzinogen durch Kenna-
way et al. (8) und die Isolierung und Identifizierung
des Benzo(a)pyrens aus Kohlenteer durch Cook et al. (9).
In den folgenden Jahrzehnten wurde neben den polyzykli-
schen Kohlenwasserstoffen eine Vielzahl von Verbindungen
unterschiedlichster Substanzklassen als Auslöser der
chemischen Karzinogenese erforscht (10): Aromatische
Amine, Nitrosamine, Aflatoxine, Diäthylstilböstrol, Vi-
nylchlorid und anorganische Stoffe wie z.B. Chrom-, Nickel-
Beryllium-Verbindungen.

Die Meinung, die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe inter-
ferierten in ihrer unveränderten Form mit den zellulären
Erbträgern, DNA und RNA, wich bald der Erkenntnis, daß
diese ansich inerten Substanzen zunächst durch ein System
mischfunktioneller Oxidasen zu elektrophilen Metaboliten
aktiviert werden, bevor sie an die nukleophilen Bindungs-
seiten von Proteinen, DNA und RNA, angreifen können (11,
12). Zentraler Bestandteil dieses, im endoplasmatischen
Retikulum der Zellen lokalisierten Enzymkomplexes, ist
das Cytochrom P-450. Es katalysiert die Hydroxylierung
eines breiten Spektrums endogener (13) und exogener Stoffe
wie Arzneimittel und Umweltschadstoffe (14). Durch gel-elek-
trophoretische Auftrennung können mindestens vier ver-
schiedene Cytochrom-Formen mit Molekulargewichten zwischen
49 000 und 56 000 unterschieden werden, deren Basiskonzentra-
tionen in der Mikrosomenfraktion nach Gabe bestimmter
Induktortypen differentiell gesteigert werden können: Pheno-
barbital, Pregnenolon-16 α -carbonitril und 3-Methylcholan-
thren (β -Naphthoflavon) (15). Wegen der Verschiebung des
Maximums des CO-Absorptionsspektrums, die mit der In-
duktion des letztgenannten Cytochroms assoziiert ist, wird
dieses als P-448 bezeichnet. An der karzinogenen Modell-

substanz Benzo(a)pyren konnte gezeigt werden, daß nicht und durch Phenobarbital induzierte Cytochrom P-450-Formen vornehmlich an der Position 3, 4 und 5 angreifen, während die durch 3-Methylcholanthren induzierten Formen die Positionen 7, 8, 9 und 10 bevorzugen (16). Intermediär gebildete Epoxide isomerisieren spontan zu Phenolen, können elektrophil an nukleophile Bindungsseiten von Proteinen, DNA und RNA angreifen, konjugieren spontan mit Glutathion oder werden enzymatisch durch die Epoxidhydratase zu trans-Dihydrodiolen oder auch durch die Glutathion-S-Transferasen zu GSH-Konjugaten umgesetzt (17, 18). Die Epoxidhydratase ist ein integraler Bestandteil der mikrosomalen Membran und als inaktivierendes Enzym (19) der durch die Monooxygenase gebildeten Epoxide günstig lokalisiert. Während die topische Verteilung der GSH-S-Transferaseaktivität mit dem Hauptteil im Zytosol und nur einem kleinen Teil in der mikrosomalen Membran, der zudem relativ schlechte kinetische Eigenschaften aufweist, unvorteilhaft ist (21, 22, 23).

Ames entwickelte ein Salmonellen-Testsystem zur Untersuchung von mutagenen Eigenschaften reaktiver Metabolite (24), das außerdem die Möglichkeit eröffnete, durch gezielte Zugabe von aktivierenden und inaktivierenden Enzymen sowie von Enzyminhibitoren die Bedeutung einzelner Umwandlungsschritte für die Kontrolle von Mutagenen abzuschätzen (25). Es wurde herausgestellt, daß bei der großen Vielfalt der trans-Dihydrodirole, die als Detoxifizierungsprodukte nach Umsatz von Epoxiden durch die EH entstehen, auch Vorstufen von besonders reaktiven Dihydrodiolepoxiden wie das Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid entstehen, deren mutagene Wirkung im Ames-Test nicht durch Zugabe reiner EH auf das Kontrollniveau gesenkt werden können (26). Abweichend von ihren inaktivierenden Eigenschaften bildet die GSHT in bis jetzt einem bekannten Fall durch Konjugation von GSH mit 1,2-Dichloräthan und verwandten Verbindungen mutagene Schwefellostverbindungen (27).

Um die Regulation und Wirkungsweise von Enzymen auf molekularer Ebene zu studieren, wurden Primärkulturen (28, 29) und etablierte Zelllinien (30, 31) als, aus der Komplexität des Ganztieres herausgelöste, in-vitro-Systeme entwickelt. DNA-, RNA- und Proteinsyntheseinhibitoren sind wegen ihrer hohen Toxizität hier besser als im Tierversuch zur Aufklärung von Regulationsvorgängen einsetzbar (32). Die Kontrolle und Induktion der Monooxygenase wurde von mehreren Autoren in verschiedenen Zelllinien untersucht (33 - 36), während erst in jüngerer Zeit erste Daten über die Induktion und Kontrolle der EH (37) veröffentlicht wurden.

Die vorliegende Arbeit soll weitere Beiträge über die Messung und Beeinflussbarkeit der MO, EH und GSHT in Zellkulturen liefern, um die Aktivitäten dieser Enzyme in eine Beziehung zu den Ergebnissen von Zellkulturstudien zur chemischen Karzinogenese (38, 39) setzen zu können. Hierbei sind zwei Aspekte zu berücksichtigen: 1. Die Stoffwechselwege chemischer Karzinogene werden durch das Muster der beteiligten aktivierenden und inaktivierenden Enzyme bestimmt (16). 2. Zahlreiche Substanzen, die im Karzinogenitätstest eingesetzt werden sollen, ändern durch induzierende oder hemmende Eigenschaften während der Inkubationszeit im biologischen System Enzymaktivitäten und bevorzugte Metabolisierungswege, um so möglicherweise erst die Voraussetzung für die Initiierung maligner Tumoren durch einen reaktiven Metaboliten zu schaffen (40).

Für diese Studie wurde die etablierte Reuber-Hepatomzelllinie H-4-II-E verwendet. Der Vorteil gegenüber Primärkulturen, ständig auf relativ konstantes Ausgangsmaterial zurückgreifen zu können, ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit des Verlustes von Stoffwechselfunktionen differenzierter Leberzellen verbunden. Sollten gezielte Manipulationen von Enzymaktivitäten der MO, EH und GSHT gelingen, erscheint es zudem sinnvoll, etablierte Zelllinien als Instrumente für Karzinogenitätstests ein-

zusetzen (40), um das rationale Verständnis über die Kontrolle reaktiver Metabolite chemischer Karzinogene und deren Angriff auf die eukaryotische Gensubstanz zu vertiefen.

2.

PROBLEMSTELLUNG

Zielsetzung der Arbeit ist, Verfahren zur Messung von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen in Zellkultur zu entwickeln und Einflüsse von Fremdsubstanzen auf die Enzymaktivitäten, wie Induktion, Aktivierung oder Hemmung, zu untersuchen. Im einzelnen gliedert sich die Arbeit wie folgt:

1. Weiterentwicklung des Meßverfahrens von H.U. Schmassmann (42) zur Bestimmung der EH mit BP-4,5-oxid als Substrat in Reuber-Hepatoma- und anderen Zellkulturen und Überprüfung der Reliabilität und Validität der Methodik.
2. Messung der EH in einer Reihe verschiedener Zelllinien.
3. Untersuchung des von H.R. Glatt (21) und F. Oesch angegebenen Meßverfahrens der GSHT-Aktivität mit BP-4,5-oxid als Substrat auf die Eignung, Induktionseffekte im Tierexperiment zu erfassen, unter Differenzierung zwischen zytosolischer und mikrosomaler GSHT-Aktivität.
4. Übertragung der oben genannten Methodik auf die Bestimmung der GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomazellkulturen.
5. Messung der GSHT-Aktivität mit den Substraten 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (43) und der MO-Aktivität mit dem Substrat 7-Äthoxycumarin (44) in Reuber-Hepatomazellen als Voraussetzung für Induktionsstudien.
6. Testung einer Substanzreihe unter Einbeziehung im Tierexperiment häufig gebrauchter Induktoren auf die Induktion der MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomazellen.
7. Untersuchung der Wirkung von α - und β -Naphthoflavon und strukturisomeren Substanzpaaren mit entgegengesetzter karzinogener Potenz auf die MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomazellen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

1. Zellkulturflaschen (75 cm^2 und 250 cm^2)
Fa. Falcon, USA
2. Zellkulturschalen (100 mm und 150 mm Durchmesser)
Fa. Falcon, USA
3. Einmalpipetten und -reagenzgefäße
Fa. Falcon, USA
4. Zellkulturmedium: Dulbecco's MEM 1 x mit NaHCO_3 ohne Glutamin
5. Zellkulturmedium: MEM Eagle mit Hank's Salzen 1 x mit NaHCO_3 ohne Glutamin
6. Fötale Kälberserum
Fa. Seromed, München, BRD
7. Glutamin-L 200 mMol 100 x
Fa. Seromed, München, BRD
8. Penicillin-Streptomycin 10 000 E/ml
Fa. Seromed, München, BRD
9. Trypsin 2,5 % in PBS ohne Ca und Mg
Fa. Seromed, München, BRD
10. Pyrogenfreies Wasser für Injektionszwecke
Fa. Schi-wa, Bad Leer-Glansdorf, BRD
11. (^3H)-Benzo(a)pyren-4,5-oxid (spezifische Radioaktivität: 1,25 mCi/mmol)
Chemisches Labor der Abteilung Molekularpharmakologie, Universität Mainz, BRD
12. Szintillationsmischung (6 g Buthyl-PBD/l 1 Toluol)
Fa. Roth, Karlsruhe, BRD
13. Rotiszint 22
Fa. Roth, Karlsruhe, BRD

14. Glutathion 99 %
Fa. Sigma, München, BRD
15. 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol 95 %
Fa. Sigma, München, BRD
16. 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol 95 %
Fa. Merck, Darmstadt, BRD
17. 7-Äthoxycumarin
Chemisches Labor der Abteilung
Molekularpharmakologie, Universität Mainz, BRD
18. NADPH
Fa. Boehringer, Mannheim, BRD
19. Glukose-6-Phosphat
Fa. Boehringer, Mannheim, BRD
20. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus
Hefe. Reinheitsgrad II, 140 U/mg
Fa. Boehringer, Mannheim, BRD
21. Rinderserum-Albumin
Fa. Sigma, München, BRD
22. Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz
Fa. Merck, Darmstadt, BRD

3.2. Geräte

1. Ultraschallhomogenisator, Braun-Sonic
300 S
Fa. Braun-Melsungen, BRD
2. Tischzentrifuge, O3 P
Fa. Hitachi, Japan
3. Zentrifuge (für 13 ml-Probenröhrchen mit
Schliffstopfen), Makrofuge
Fa. Heraeus Christ, Osterode, BRD
4. Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge, Sorvall RC-5
Fa. Dupont, FR

5. Ultrazentrifuge, Modell L5-65
Fa. Bekman, USA
6. Sterile Arbeitsbank
Fa. SLEE, London, GB
7. Roto-Shake
Fa. Kühner, Basel, CH
8. Flüssigkeits-Szintillations-Meßgerät,
Isocap 300
Fa. Searle Nuclear Chicago Division, USA
9. Spektrophotometer, Modell 25
Fa. Bekman, USA
10. Aminco Fluorometer SPF-500
Fa. Aminco-Bowman, USA
11. Inkubator für Zellkulturen
Fa. Wedco, USA

3.3. Zusammensetzung der Zellkulturmedien

1. Dulbecco's MEM (für Humanfibroblasten)

Dulbecco's MEM	1 x	500	ml
L-Glutamin	200 mM	10	ml
Penicillin-Streptomycin		5	ml
10 000 E bzw. 10 000 µg/ml			
		515	ml
- + 16 % fötales Kälberserum
(für Humanfibroblasten)

	82,5	ml
--	------	----
- + 10 % fötales Kälberserum
(für NIH 3T3-, SV-40 NIH 3T3- und BHK-21-Zellen)

	51,5	ml
--	------	----

2. MEM Eagle mit Hank's Salzen

MEM Hank's	1 x	500	ml
L-Glutamin	200 mM	5	ml
Penicillin-Streptomycin		5	ml
10 000 E bzw. 10 000 µg/ml			
		510	ml
+ 10 % fötales Kälber-			
serum		51,0	ml
(für Reuber-Hepatomzellen			
H-4-II-E)			

3.4.

Selbst hergestellte Lösungen

1. 0,9 %ige gepufferte Salzlösung (PBS),
pH 7,4

NaCl 8,00 g/l

KCl 0,20 g/l

Na₂HPO₄ 1,15 g/l

KH₂PO₄ 0,20 g/l

2. Trypsinlösung

Trypsin in PBS 1:10 (v/v)

3.5.

Tiere

1. Sprague-Dawley-Ratten

Wiga - Versuchstieranstalt, Sulzfeld

2. Fischer-Ratten

Zentralinstitut für Versuchstierhaltung,
Hannover

3. Balb/c-Mäuse

Jackson Laboratory, Bar Harbor,
Maine, USA

4. NMRI-Mäuse

Fa. Ivanovas, Kisslegs im Allgäu

5. CF-1-Mäuse

Issa Credo, Les Oncins, Saint
Germain sur L'Arbresle, FR

6. Syrische Goldhamster

T. Davidowski, Bonnheim bei Alzey

7. Rhesus-Affen

Fa. Merck, Darmstadt, BRD

8. Beagle-Hunde

Fa. Hoechst, Frankfurt, BRD

3.6. Methoden

3.6.1. Kultivierung der Zellen

3.6.1.1. Herkunft und Anzucht der verschiedenen Zelllinien

Die BHK-21-, die NIH 3T3- und die SV-40 transformierten NIH 3T3 Zelllinien stammen aus dem Labor von Prof. M.M. Burger, Biozentrum Basel. Die Humanfibroblasten-Zelllinien PK-1, WW-1 und HG-7 wurden von Dr. H. Rüdiger in Hamburg zur Verfügung gestellt.

Die Anzucht aller Zellen erfolgte in einem Zellkulturinkubator (Fa. Wedco, USA) bei 37°C und einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂. Das Medium wurde 2- bis 3-tägig bis zum Erreichen einer Dichte von 50 000 - 80 000 Zellen pro cm² gewechselt.

Die SV-40 transformierten NIH 3T3-Zellen erforderten wegen ihres besonders schnellen Wachstums täglich einen Wechsel des Mediums. Sie besaßen im Gegensatz zu den anderen verwendeten Zellen die Fähigkeit zur Vermehrung in Suspension.

Die Reuber-Hepatom-Zelllinie H-4-II-E wurde von Dr. J. Gielen in Lüttich zur Verfügung gestellt. Die Zellen waren in MEM-Hank's Nährmedium mit 10 % Glycerin in Plastikampullen zu je ca. 2 Mio. Zellen pro 2 ml in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der Transport erfolgte in einem Thermo-Isoliergefäß auf Trockeneis. Zum Anzüchten der Hepatozyten wurde der Inhalt einer Ampulle im Wasserbad bei 37°C rasch aufgetaut. Um die Zellen von einander zu trennen, wurden sie mit einer englumigen Pipette unter mehrmaligem Aufsaugen entnommen und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit 15 ml MEM-Hank's Nährmedium gegeben, das abweichend von der Standardzusammensetzung 20 % fötales Kälberserum enthielt. Etwa 6 bis 8 Stunden später, nachdem sich die Zellen auf dem Boden der Kulturflasche

abgesetzt hatten, wurden sie mehrfach mit Medium zur Entfernung des Glycerins und von Zellbruchstücken gespült.

3.6.1.2. Subkulturverfahren zur Vermehrung der Zellen

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit 5 ml PBS unter vorsichtigem Schwenken der Kulturen gespült. Zum Ablösen von der Grundfläche und zum Trennen der Zellen voneinander wurden 2 ml 0,25 %ige Trypsin-PBS-Lösung in 75 cm²-Kulturflaschen gegeben und für 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden durch mehrmaliges Aufsaugen einzelne Zellen gewonnen. Die proteolytische Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 3 ml Medium gestoppt. Die Humanfibroblasten und 3T3-Zellen wurden abzentrifugiert, in 2 bis 3 ml Medium suspendiert und in einer Verdünnung von 1:3 in neue Kulturflaschen oder auf Kulturschalen plattiert. Die Wiederansaat der Reuber-Hepatom- und der BHK-Zellen erfolgte in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:20. Die Zellen einer SV-40 3T3-Kulturflasche wurden auf 10 bis 40 weitere Kulturflaschen aufgeteilt.

3.6.2. Tierleberpräparation zur Gewinnung von Mikrosomen und Zytosol

Die Organe wurden in 3 Volumenteilen 150 mM KCl-Lösung, die 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,4 enthielt, mit einem Potter-Elvehjem-Glashomogenisator homogenisiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 10 000 g. Der gewonnene Überstand wurde eine Stunde lang bei 100 000 g zentrifugiert. Die mikrosomalen Pellets wurden in 150 mM KCl-Lösung, gepuffert mit Na-Phosphat pH 7,4, resuspendiert. In dieser Fraktion (Proteingehalt 7 - 10 mg/ml) wurde die Monooxygenase und die Epoxidhydratase gemessen, während zur Messung der mikrosomalen GSH-S-Trans-

ferase eine weitere Zentrifugation bei 100 000 g und Resuspendierung in KCl angeschlossen wurde. Der 100 000 g-Überstand diente als Ausgangspräparation für Proteinverdünnungsreihen zur Bestimmung der zytoplasmatischen GSH-S-Transferasen. Nach der Entnahme der Organe wurden alle Präparationsschritte unter Kühlung zwischen 0°C und 4°C ausgeführt.

3.6.3. Proteinbestimmung nach Lowry

Die angegebenen Enzymaktivitäten wurden auf den Proteingehalt der homogenisierten Proben bezogen. Die Proteinbestimmung wurde nach der von Lowry (45) angegebenen Methode durchgeführt.

Die Reagentien waren:

A Stammlösung I CuSO_4 1 g in 100 ml H_2O

II NaK-Tartrat 2 g in 100 ml H_2O

III Na_2CO_3 20 g in 1000 ml 0,1 N NaOH

Reagenz A wurde vor der Bestimmung aus 1 Teil I, 1 Teil II und 98 Teilen III hergestellt.

B 1 Teil Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz

1 Teil H_2O

Das Volumen der Probe (10 μl bis 100 μl) wurde mit Wasser auf 0,5 ml aufgefüllt, dazu 5 ml von Reagenz A gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 0,5 ml Reagenz B folgte eine weitere Inkubationsperiode bei Raumtemperatur von 30 Minuten. Die Messung der Extinktion erfolgte im Photometer gegen einen mitgeführten Leerwert bei einer Wellenlänge von 750 nm. Die ermittelten Werte wurden auf eine Standardkurve bezogen, die mit Rinderserumalbumin erstellt wurde.

3.6.4. Enzymmessungen

3.6.4.1. Messung der Epoxidhydrataseaktivität

Das Verfahren zur Messung der Epoxidhydratase wurde an die von H.U. Schmassmann et al. (42) angegebene Methode angelehnt. Als Substrat diente (^3H)-Benzo(a)pyren-4,5-oxid mit einer spezifischen Aktivität von 1,25 mCi/mmol (1250 cpm/nmol).

In konische 13 ml Zentrifugengläschen mit Glasschliffstopfen wurde der wie folgt zusammengesetzte Inkubationsansatz pipettiert:

- 0,1 ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 9,5
- 0,2 - 0,3 ml 150 mM KCl-Lösung
- 0,1 - 0,2 ml Zellhomogenat

Das Ansatzvolumen betrug jeweils 0,5 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 nmol Benzo(a)pyren-4,5-oxid in 25 μl Acetonitril gestartet. Die Inkubationszeit betrug 10 bis 30 Minuten in einem Schüttel-Wasserbad bei 37°C. Zum Stoppen des enzymatischen Umsatzes wurden 3,5 ml Petroläther zugefügt, die Proben geschüttelt, im Eisbad gekühlt und mit 0,5 ml DMSO versetzt. Die Extraktion des nicht verbrauchten Substrates erfolgte auf einem Rotationsschüttler (Roto-Shake, Fa. Kühner AG, Basel) bei 40 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten. Nach dem Zentrifugieren der Proben bei 400 g wurde die obere Phase abgesaugt. Dieser Vorgang wurde bei Extraktionszeiten von 5 Minuten zweimal wiederholt, worauf die Extraktion des Reaktionsproduktes, des Benzo(a)pyren-4,5-dihydrodiols, mit 1 ml Äthylacetat für 10 Minuten auf dem Rotationsschüttler folgte. Nach erneuter Phasentrennung durch Zentrifugation bei 400 g wurde ein 0,5 ml-Aliquot der Äthylacetatphase jeder Probe in ein Szintillationsgefäß überführt und mit 6 ml Szintillationsflüssigkeit (6 g Butyl-PBD in 1 Liter Toluol) versetzt. Die Impulsrate der Probe wurde sodann im Flüssigkeits-

szintillations-Meßgerät, Isocap 300 (Fa. Searle Nuclear Chicago Division, USA) bestimmt.

Zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivität wurde neben der eingesetzten Proteinmenge, der Inkubationszeit und der spezifischen Radioaktivität des Substrates die Extraktionsausbeute des BP-4,5-diols von 80 % berücksichtigt.

3.6.4.2. Messung der Glutathion-S-Transferaseaktivität mit Benzo(a)pyren-4,5-oxid als Substrat

Die Grundlage zur Bestimmung der GSHT-Aktivität mit BP-4,5-oxid als Substrat bildete die Methode von Glatt und Oesch (21). Die Reaktion wurde in 6 ml-Zentrifugengläschen mit Schliffstopfen durchgeführt. Die Inkubationsansätze von 1 ml Gesamtvolumen wurden im Eisbad zusammengestellt. Sie enthielten im einzelnen:

- 0,025 - 0,2 ml Proteinlösung oder -suspension
(entsprechend 0,007 - 2 mg Protein)
- 0,5 ml GSH-Lösung 10 mM in Na-Phosphat-Puffer (0,2 M, pH 7,5)
- 0,3 - 0,475 ml KCl-Lösung 150 mM

Die Proteinlösung oder -suspension bestand je nach Art der Untersuchung aus dem 100 000 g-Überstand von Organhomogenaten, einer Mikrosomensuspension, einem Zellkulturhomogenat oder dessen 10 000 g-Überstand.

Die Reaktion wurde nach einminütiger Vorinkubation im Schüttelwasserbad bei 37°C durch die Zugabe von 20 µl Substratlösung (1,5 mg (³H)-BP-4,5-oxid in 1 ml DMSO, spezifische Radioaktivität 1,25 mCi/mMol) gestartet. Der Zusatz von 2 ml Äthylacetat und das Abkühlen der Gefäße im Eisbad beendeten die Inkubation. Es folgte die Extraktion auf dem Roto-Shake bei 40 rpm, die Phasentrennung durch Zentrifugation mit 400 g und die Entfernung der oberen Phase durch Absaugen. Nach der Wieder-

holung dieses Vorgangs wurde ein 500 µl-Aliquot der Wasserphase in ein Szintillationsgefäß überführt, mit 10 ml Szintillationsgemisch, Rotiszint 22, versetzt und gemessen.

Da sich die Radioaktivität der Wasserphase neben dem spontan und dem enzymatisch gebildeten GSH-Konjugaten aus einer geringen Menge weiterer BP-Metabolite und an Makromoleküle gebundene Produkte zusammensetzte, wurden die folgenden Blindwerte zur Berechnung der Enzymaktivität berücksichtigt:

I : Inkubation mit Puffer, BP-4,5-oxid, ohne GSH

II : Inkubation mit Puffer, BP-4,5-oxid, Protein, ohne GSH

III: Inkubation mit Puffer, BP-4,5-oxid, mit GSH

Die Zählrate der enzymatischen Konjugation ergibt sich demzufolge aus der Formel:

$$\text{Zählrate der enzymatischen Produktbildung} = \text{Gesamtzählrate} + \text{I} - \text{II} - \text{III}$$

3.6.4.3. Messung der Glutathion-S-Transferaseaktivität mit den Substraten 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol

Nach der Methode von Habig et al. (43) wurde die Glutathion-S-Transferaseaktivität unter direkter Verfolgung der Produktbildung in einem Doppelstrahl-Spektrometer gemessen. Die Extinktionsdifferenz zwischen einer Blindwertinkubation und einer enzymatisch aktiven Probe wurde mittels eines Direktschreibers aufgezeichnet. Die Reaktionstemperatur betrug 25°C. Die Inkubationsansätze enthielten bei einem Gesamtvolumen von 2 ml im einzelnen:

- 1.) Messung mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
1,7 ml 1,18 mM DNCB in 118 mM Na-Phos-
 phat-Puffer pH 6,5
0,02 - 0,2 ml Proteinlösung oder -suspension
 (0,01 - 0,4 mg Protein)
ad 1,9 ml H₂O
Start der Reaktion mit 2 µmol GSH in 100 µl
Wasser, mit 25 mM Na-Phosphat auf pH 6,5
eingestellt. Extinktionsmessung bei 340 nm.
- 2.) Messung mit 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol
1,7 ml 1,18 mM DCNB in 118 mM Na-Phos-
 phat-Puffer pH 7,5
0,01 - 0,1 ml Proteinlösung oder -suspension
 (0,01 - 0,4 mg Protein)
ad 1,8 ml H₂O
Start der Reaktion mit 10 µmol GSH in 200 µl
Wasser, mit 25 mM Na-Phosphat auf pH 7,5
eingestellt. Extinktionsmessung bei 345 nm.

3.6.4.4. Messung der Monooxygenaseaktivität in Reuber-Hepatomzellen

Die O-Desalkylierung von 7-Äthoxycumarin durch Leber-
mikrosomen als direkter fluorometrischer Test, be-
schrieben von Ullrich und Weber (44), diente als
Grundlage zur Bestimmung der Monooxygenaseaktivität
in Reuber-Hepatomzellen. Die Produktbildung wurde in
einem Aminco Fluorometer, Modell SPF-500, bei einer
Excitationswellenlänge von 380 nm und einer Emissions-
wellenlänge von 460 nm gemessen und mittels eines
Direktschreibers verfolgt. Die Temperatur der thermo-
statisierten Küvette betrug 37°C. Die Inkubationsan-
sätze waren bei einem Gesamtvolumen von 2 ml wie
folgt zusammengesetzt:

1,5 ml	$1,33 \cdot 10^{-4}$ M Äthoxycumarin in 0,133 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,9
0,2 ml	$5 \cdot 10^{-4}$ M NADPH, $1 \cdot 10^{-2}$ M Glukose- 6-Phosphat und 0,42 U Glukose-6- Phosphat-Dehydrogenase
0,02 - 0,2 ml	Ganzzeilsuspension, Menge des zugegebenen Proteins zwischen 0,08 und 1 mg.
ad 2 ml	H ₂ O

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Zeilsuspension ge-
startet. Nachdem 1 bis 2 Minuten später der Tempera-
turausgleich auf 37°C in der Kuvette eingetreten war, wurde
die Registrierung der Produktbildung aufgenommen.

4. ERGEBNISSE

4.1. Verfeinerung und Überprüfung der Gültigkeit von Meßverfahren für die Epoxidhydratase-, GSH-S-Transferase- und Monooxygenaseaktivitäten in Reuber-Hepatomzellkulturen

4.1.1. Weiterentwicklung des Verfahrens zur Messung der Epoxidhydratase in Zellkulturen

Die schematische Übertragung des von H.U. Schmassmann et al. (42) entwickelten Verfahrens zur Messung der Epoxidhydratase mit dem Substrat Benzo(a)pyren-4,5-oxid in mikrosomalen Fraktionen von Ratten- und Mäuseorganen auf die Homogenate von Monolayer-Zellkulturen ergab zunächst keine brauchbaren Ergebnisse. Die Messungen der enzymatisch aktiven Proben lagen in Relation zu den Blindwerten sehr niedrig. Die zudem ungewöhnlich große Streuung der Meßwerte machte eine Quantifizierung der enzymatischen Umsatzraten häufig unmöglich. Diese Befunde führten zu Bemühungen um eine Verfeinerung der Methodik.

Die geringen Ausbeuten an Zellprotein, die bei Verwendung von 75 cm²-Zellkulturflaschen in Abhängigkeit von der Zelllinie zwischen 0,5 mg und 4 mg betrugen, machten für Serienmessungen den Verzicht auf die Gewinnung von 100 000 g-Fractionen notwendig. Durch das Einsetzen relativ großer Volumina von Ganzzeellsuspensionen oder -homogenaten in den Inkubationsansatz wurden die Cofaktor-Beifügungen und das Muster der begleitenden Enzyme sowohl qualitativ wie auch quantitativ gegenüber der von Schmassmann ursprünglich angegebenen Meßmethode verändert. Zum Beispiel hat die vermehrte Anwesenheit des intrazellulären Glutathions, der Glutathion-S-Transferasen, der Glucuronsäure- und Sulfotransferasen und der Dihydrodioldehydrogenase zu

Interferenzmöglichkeiten mit der Epoxidhydratase-messung unter Verwendung von BP-4,5-oxid als Substrat geführt. Dies zwang zur Überprüfung der Gültigkeit des Meßverfahrens.

4.1.1.1. Verringerung des Blindwertes

Zur Verringerung des Blindwertes wurde die Substratkonzentration auf 50 μ M gesenkt und das BP-4,5-oxid speziell dünn-schichtchromatographisch aufgereinigt. In möglichst wenig Benzol gelöst wurde hierzu etwa 1 mg BP-4,5-oxid auf eine Silicagel-Dünnschichtplatte mit Fluoreszenzindikator (Fa. Merck) aufgetragen. Das Laufmittel bestand aus 97,5 % Benzol und 2,5 % Tri-äthylamin v/v. Nach der Chromatographie unter Licht-ausschluß wurde die Platte bis auf einen kleinen Streifen mit Aluminiumfolie bedeckt. Auf diesem Streifen wurde unter der UV-Lampe die BP-4,5-oxid-Bande identifiziert. Unter Aussparung des Markierungsfleckes wurde das Silikagel der Substratbande von der Glasunterlage der Platte abgekratzt. Nach zweifacher Elution mit Acetonitril erfolgte die Einengung der Substratlösung auf dem Rotationsverdampfer auf die endgültige Gebrauchskonzentration von 1 μ M. Zur Identitätskontrolle wurde ein UV-Spektrum angefertigt. Die erhaltene Kurve mit den Vorbandenmaxima bei 328 nm, 315 nm, 300 nm und 290 nm und dem Absorptionsmaximum bei 275 nm entspricht dem von Mc Caustland et al. (46) angegebenen Spektrum.

Tabelle 1: Sensitivitätssteigerung gegenüber dem Routine-
meßverfahren zur Bestimmung der Epoxid-
hydrataseaktivität in Rattenmikrosomen

	Blindwert [cpm]	Substratein- satz [cpm]	Blindwert·200 Substrateins.	rel. Sen- sivität
Substrat ohne Aufreinigung	561 ± 14,5	46140 ± 500	2,4 %	1
Substratauf- reinigung I	68,9 ± 9,9	43190 ± 107	0,32 %	7,5
Substratauf- reinigung II	57,3 ± 6,2	41200 ± 400	0,28 %	8,6

Nach den Angaben Schmassmanns (42) hat der Blindwert 1,6 bis 1,9 % des Substrateinsatzes betragen. Durch die Substrataufreinigung wird es möglich, den Blindwert substanziell zu verringern (Tabelle 1), so daß ein Umsatz von 33 pmol BP-4,5-oxid pro Inkubation bereits dem doppelten Blindwert entspricht. Bei einer Proteinzugabe von 1 mg und einer Inkubationszeit von 1 Stunde liegt die Bestimmbarkeitsgrenze des Epoxidhydrataseumsatzes bei einer spezifischen Aktivität von 0,5 pmol/mg Protein/min.

4.1.1.2. Abhängigkeit der Epoxidhydratase in Zell- kulturhomogenaten von der Ultraschallbe- handlung

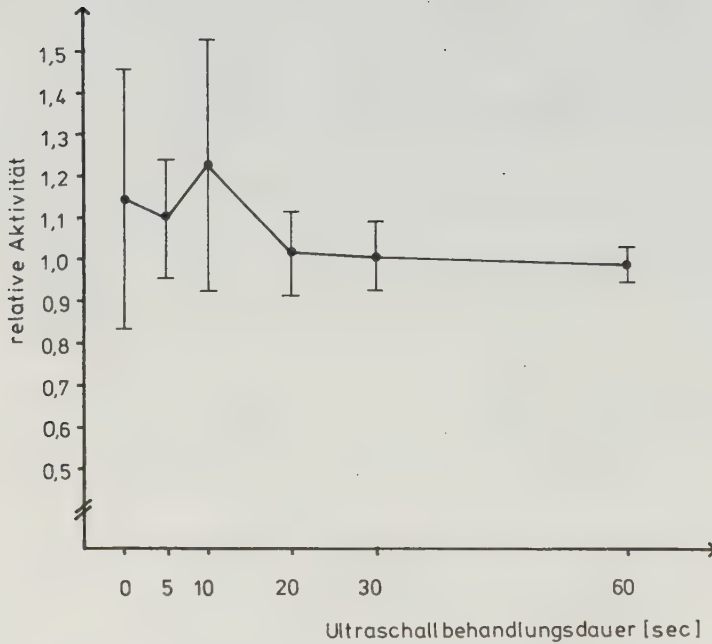
Für die Epoxidhydratasebestimmung führte sowohl die Verwendung von Ganzzellen als auch der Einsatz von Homogenaten, die mit einem Glas-Elvehjem-Potter hergestellt wurden, zu erheblichen Streuungen der Meßwerte. Dies zwang zur Entwicklung eines anderen Verfahrens zur

Zellhomogenisierung. Von 150 mm-Zellkulturschalen wurden konfluente Reuber-Hepatomezellen (Zelldichte: 70 000 Zellen/cm²) geerntet und zweimal mit 150 mM KCl gewaschen. Eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen wurde durch Schütteln der Suspension angestrebt, die darauf in 1,5 ml-Portionen aufgeteilt wurden. Die Ultraschallbehandlung erfolgte mit einem Braun-Melsungen 300 S Sonicator bei 60 % der maximalen Intensität unter Kühlung der Probenröhrchen im Eiswasserbad. Um eine übermäßige Erhitzung der verwendeten Nadelsonde zu verhindern, wurden längere Ultraschallbehandlungen in 10 sec-Intervalle unterteilt. Die Abhängigkeit der Mittelwerte und Standardabweichungen der EH-Messungen in Reuber-Hepatomezellen von der Ultraschallbehandlungsdauer ist in der Figur 1 dargestellt. Die Verringerung des Variationskoeffizienten der Mehrfachbestimmungen bei intensiver Ultraschallhomogenisierung der Reuber-Hepatomezellen wird durch die Figur 2 verdeutlicht.

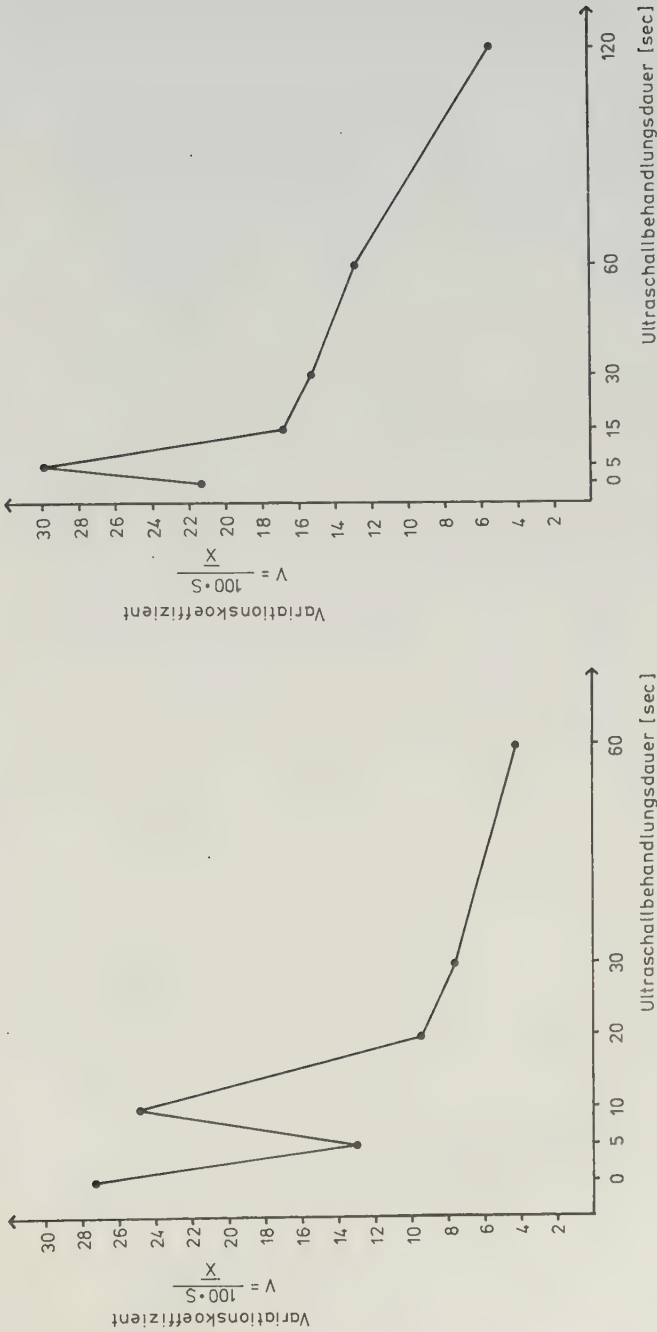
Eine Ultraschallbehandlungsdauer der Reuber-Hepatomezellen von 60 sec mit der Nadelsonde des 300 S Sonicators (Fa. Braun-Melsungen) bei 60 % der maximalen Intensität reicht aus, gut reproduzierbare Meßwerte mit geringer Streuung, der Epoxidhydratasemessung in Lebermikrosomen entsprechend, zu erhalten. Bei den folgenden Messungen von Reuber-Hepatomezellen wurden stets die angegebenen Bedingungen, wenn nicht anders erwähnt, eingehalten.

Die Homogenisierung einiger anderer Zelllinien erwies sich jedoch als schwieriger. Beispielhaft ist in der Figur 3 die Abhängigkeit des Variationskoeffizienten der Mehrfachbestimmungen der Epoxidhydratase in 3T3-Zellen von der Ultraschallbehandlungsdauer abgebildet.

Eine Ultraschallbehandlungsperiode von 120 sec, unter den gleichen Bedingungen wie für Reuber-Hepatomezellen beschrieben, erwies sich als ausreichend, um die Epoxidhydratase in Humanfibroblasten, 3T3- und BHK-Zellen gut reproduzierbar und präzise zu bestimmen.



Figur 1: Abhängigkeit der EH-Messung in Reuber-Hepatomzellen von der Ultraschallbehandlung.
Versuchsbedingungen: 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 9,0 , 0,4 mg und 0,8 mg Proteinzugabe, 30 min Inkubationszeit. Ein Meßpunkt und die dazugehörige Standardabweichung repräsentiert 5 bis 6 Meßwerte.



Figuren 2 (links) und 3 (rechts): Abhängigkeit der Mehrfachbestimmungen der EH-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen (Figur 2) und 3T3-Zellen (Figur 3) von der Ultraschall-homogenisierung. Der Variationskoeffizient wurde jeweils aus Mittelwert und Standardabweichung von 5 bis 6 Einzelbestimmungen gebildet.

4.1.1.3. Nachweis der Validität des Meßverfahrens der Epoxidhydratase in Reuber-Hepatomzellen

4.1.1.3.1. Radiochromatogramm der Äthylacetatphase

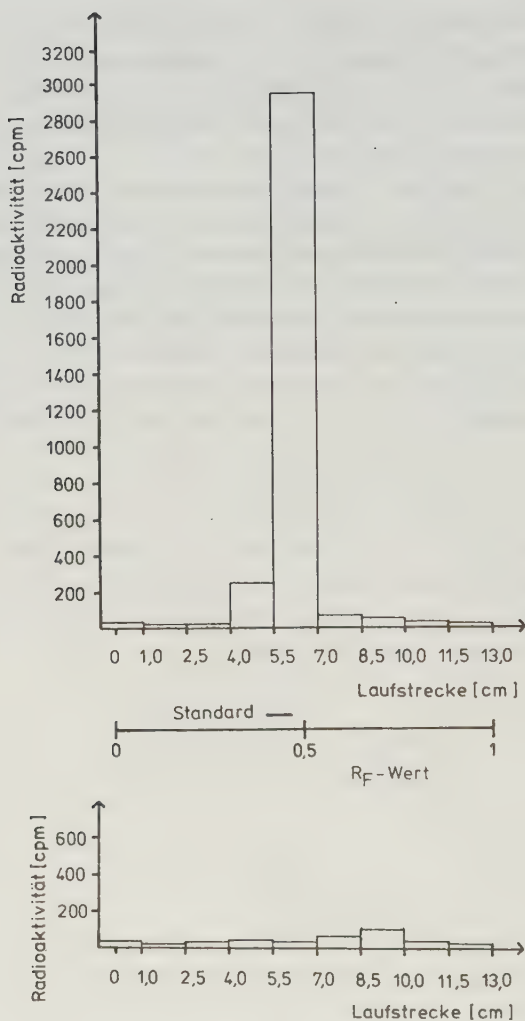
Nach der Sicherung von Quantifizierbarkeit der Messung hatte der Nachweis der Validität durch Identifizierung der Radioaktivität der im Szintillationsspektrometer gezählten Äthylacetat-Phase zu erfolgen. Nach dem Standardinkubations- und Extraktionsschema (3.6.4.1.) wurde sowohl eine Serie zu 5 Proben mit enzymatisch aktivem als auch eine gleichen Umfangs mit durch zehnmütiges Kochen denaturiertem Reuber-Hepatomzellhomogenat angesetzt. Die Zellen wurden wie beschrieben (4.1.1.2.) durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Der Proteineinsatz pro Probe war 1 mg, und die Inkubationszeit betrug 30 min.

Nach dem letzten Extraktionsschritt wurden die Äthylacetat-Phasen der 5 Proben jeder Gruppe vereinigt, auf dem Rotationsverdampfer eingeengt und mit Benzol/Äthanol als Laufmittel im Verhältnis 5:1 (v/v) auf Silicagel-Dünnschichtplatten chromatographiert. Auf die Startbande wurde als Vergleichssubstanz nicht radioaktives trans-4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo(a)pyren aufgetragen. Die Laufstrecke betrug 13 cm. Nach der Markierung der Hauptbande unter UV-Licht folgte, 0,5 cm vor der Startlinie beginnend, die Unterteilung der Platten in zehn 1,5 cm breite Streifen. Das Silicagel wurde abgelöst und in Szintillationsgefäße gefüllt. Die Radioaktivität wurde durch Ausschütteln mit 6 ml Szintillationsflüssigkeit (6 g Butyl-PBD/1 Toluol) vom Silicagel eluiert und nach der Sedimentierung der festen Bestandteile gemessen. Die Figur 4 zeigt die Verteilung der Radioaktivität auf der Chromatographieplatte der enzymatisch aktiven und nicht aktiven Probengruppen in Relation zum nicht radioaktiven Standardfleck (R_F -Wert 0,39 - 0,44).

Das gezeigte Radiochromatogramm der enzymatisch aktiven

Inkubation weist einen Gipfel mit den exakt gleichen Laufeigenschaften wie der BP-4,5-diol-Standard auf. Chromatogramme, nicht ausreichend durch Ultraschall homogenisierter Zellpräparationen, zeigten einen zweiten Gipfel mit einem R_F -Wert von 0,68 - 0,73, der der Laufcharakteristik des BP-4,5-oxids entspricht. Daraus läßt sich schließen, daß die Proteinaggregate schlecht homogenisierter Zellaufbereitungen die Entfernung des Substrates durch den Petroläther stören und somit mittels der Äthylacetat-Extraktion neben dem Produkt zusätzlich Substratreste der DMSO/H₂O-Phase entzogen werden. Dieser Befund wird gestützt durch die Beobachtung einer scheinbar höheren mittleren Aktivität der weniger gut gegenüber den gründlicher ultraschallhomogenisierten Zellen (Figur 1).

Das Ziel der folgenden Untersuchung war außer der eventuellen Erfassung eines relevanten Folgemetabolismus des Produktes die Quantifizierung der Produktausbeute.



Figur 4: Radiochromatogramme der Äthylacetat-Phase. Im oberen Teil ist das Radiochromatogramm der enzymatisch aktiven Proben dargestellt. Im unteren Teil ist das Radiochromatogramm des denaturierten Reuber-Hepatomzellhomogenates abgebildet. Das Protein wurde durch 10-minütiges Kochen inaktiviert. Der Proteingehalt der Einzelinkubation beider Chromatogramme war 1 mg und die Inkubationszeit 30 min. Es wurden jeweils die Äthylacetat-Phasen von 5 Proben zusammengefaßt.

4.1.1.3.2. Präparation von trans-4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo(a)pyren

In vier 50 ml-Gefäßen wurden je 1,3 μmol (^3H)-BP-4,5-oxid (spez. Aktivität 1,25 mCi/mmol), gelöst in 300 μl Acetonitril, einer Inkubationslösung zugesetzt, die aus 1 ml Tris-HCl-Puffer pH 9,0 und 4 ml Rattenmikrosomen (Rattenstamm: Sprague-Dawley, Proteingehalt der Mikrosomen-suspension: 7 mg/ml) bestand. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde das Produkt zweimal mit 10 ml Äthylacetat ausgeschüttelt, worauf die Lösungsmittelphasen der 4 Reaktionsgefäße vereinigt, auf dem Rotationsverdampfer unter Vakuum bei 30° C eingeengt und mit wasserfreiem Na_2SO_4 getrocknet wurden.

Hierauf schloß sich die chromatographische Reinigung auf 4 Silicagel-Dünnschichtplatten mit einem Benzol/Äthanol-Laufmittel (5 Volumenteile Benzol + 1 Volumenteil Äthanol) an. Autentisches, von Dr. P. Sims aus London zur Verfügung gestelltes cis-4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo(a)pyren, diente bei der Chromatographie als Referenzsubstanz. Die Produktbande wurde im UV-Licht identifiziert, unter Aus-sparung des Referenzflecks abgekratzt und zweifach mit Äthanol extrahiert. Das Silicagel wurde durch Zentrifugation entfernt. Nach der Vereinigung der Äthanol-Extrakte ergab die Messung eines Aliquots im Szintillationszähler eine präparative Gesamtausbeute von 74,6 %, bezogen auf das eingesetzte Substrat.

Es folgte die Anfertigung eines UV-Spektrums zum Identifizieren des Produktes. Die Vorbandenmaxima bei 324 nm und 298 nm und das Absorptionsmaximum bei 273 nm stimmen mit den Literaturangaben (Mc Caustland, 46) überein. Der dekadische Extinktionskoeffizient, der sich aus der von Mc Caustland (46) angegebenen Graphik berechnen läßt, gleicht dem gefundenen Wert von $1,0 \cdot 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Die Lösung des (^3H)-trans-4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo(a)pyrens in Äthanol wurde auf dem Rotationsverdampfer auf eine Gebrauchskonzentration von 1,12 μM eingeengt.

4.1.1.3.3. Untersuchung auf eine Folgereaktion des trans-4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo(a)pyrens unter den Reaktionsbedingungen der Epoxidhydratasebestimmung in Reuber-Hepatomzellkulturen

Es wurde nach dem gleichen Inkubations- und Extraktions-schema wie zur Bestimmung der Epoxidhydratase in Zellkulturen (3.6.4.1.) verfahren. Die Ultraschallbehandlung der Hepatomzellen erfolgte unter den angegebenen optimalen Bedingungen (4.1.1.3.1.). Die Inkubation wurde jedoch mit der Zugabe von 28 μmol trans-4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo(a)pyren in 25 μl Äthanol gestartet.

Tabelle 2: BP-4,5-diol-Ausbeuten in Abhängigkeit von der Proteinmenge und Inkubationszeit unter den Reaktionsbedingungen der Epoxidhydratasemessung

Proteinmenge [mg]	Inkubationszeit [min]			
	0	10	20	30
0	80,3 %	80,9 %	79,7 %	80,1 %
0,22	--	82,3 %	74,2 %	78,3 %
0,44	--	80,0 %	78,0 %	76,0 %
0,88	73,0 %	72,9 %	79,7 %	68,2 %

Die angegebenen Meßwerte sind wenigstens aus Doppelbestimmungen errechnet. Die Standardabweichungen lagen zwischen 1 % und höchstens 5 %.

In Fortführung des oben beschriebenen Versuchs wurde nach der üblichen Entnahme des 500 μl -Aliquots der Rest der Äthylacetat-Phase abgesaugt und eine weitere Extraktion mit 2 ml Äthylacetat angeschlossen. Zur Untersuchung der wasserlöslichen Radioaktivität, um möglicherweise gebildete Konjugate des BP-4,5-diols erfassen zu können, wurden 300 μl der DMSO/H₂O-Phase im Szintillationszählgerät gemessen.

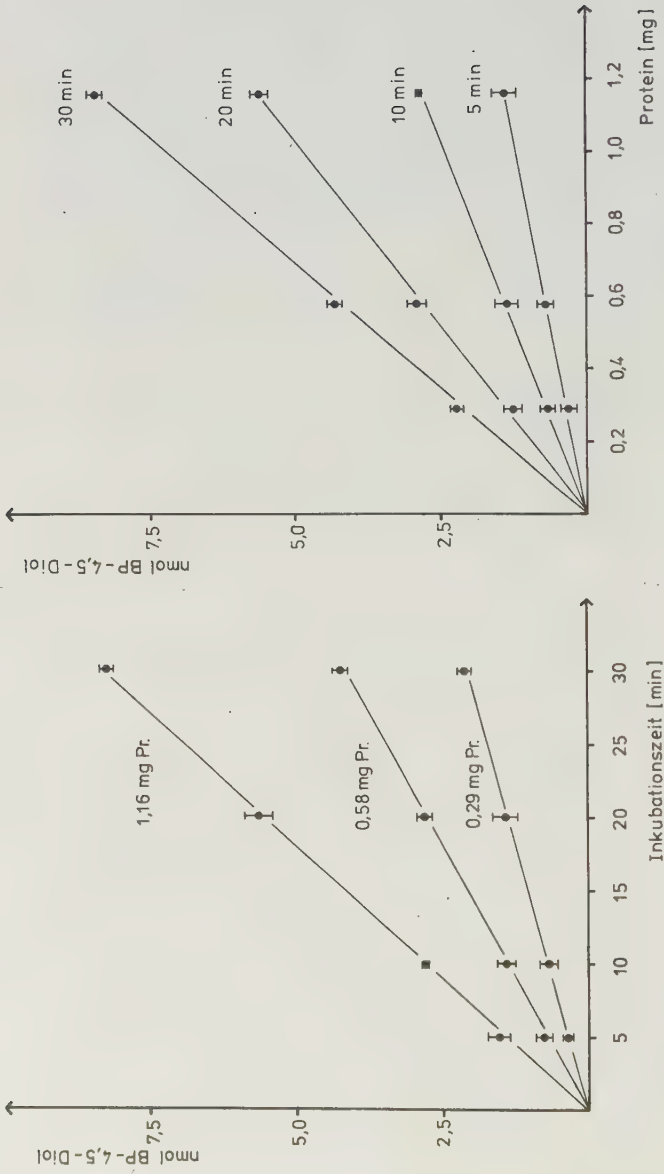
Tabelle 3: Radioaktivität der DMSO/H₂O-Phase in Prozent
der Radioaktivität des zugegebenen BP-4,5-diols

Proteinmenge [mg]	Inkubationszeit [min]			
	0	10	20	30
0	1,8 %	1,9 %	1,9 %	1,8 %
0,22	--	1,7 %	1,6 %	1,7 %
0,44	--	1,8 %	1,7 %	1,9 %
0,88	1,8 %	1,7 %	1,9 %	3,9 %

Das bei der Epoxidhydratasebestimmung in Zellhomogenaten gebildete Produkt wird nicht in quantitativ bedeutsamer Weise weitermetabolisiert. Der nicht völlig auszuschließende geringfügige Produktverlust bei der höchsten Proteinkonzentration und bei 30 min Inkubationszeit schränkt die Linearität der Epoxidhydratasemessung mit Zeit und Protein, wie die nächste Untersuchung zeigt, auch in diesem Bereich nicht merkbar ein.

4.1.1.3.4. Untersuchung der Epoxidhydrataseaktivität in Homogenaten von Reuber-Hepatomzellen auf Linearität mit Zeit und Protein

Es wurden von 10 konfluenten 150 mm-Zellkulturschalen (Zelldichte: 70 000/cm²) Reuber-Hepatomzellen abgelöst, gewaschen, gepoolt und unter optimierten Bedingungen (4.1.1.2.) ultraschallhomogenisiert. Die Figur 5 zeigt, daß die Reaktion bis zum Einsatz von 1,2 mg Protein und bis zur Inkubationszeit von 30 min linear verläuft. Wenn es sich in Einzelfällen als notwendig erwies, diese Werte zu überschreiten, wurde durch Messung von mindestens zwei Proteinkonzentrationen bei zwei Inkubationszeiten die Linearität des Substratumsatzes gesichert.



Figur 5: Linearität der Epoxidhydratasemessung in Reuber-Hepatomzellhomogenaten mit Zeit und Protein. Die Werte sind Mittel und Standardabweichungen aus Doppelbestimmungen.

4.1.1.3.5. Messung der wasserlöslichen Nebenprodukte
bei der Inkubation von BP-4,5-oxid mit
Homogenaten von Reuber-Hepatoma-Zellen

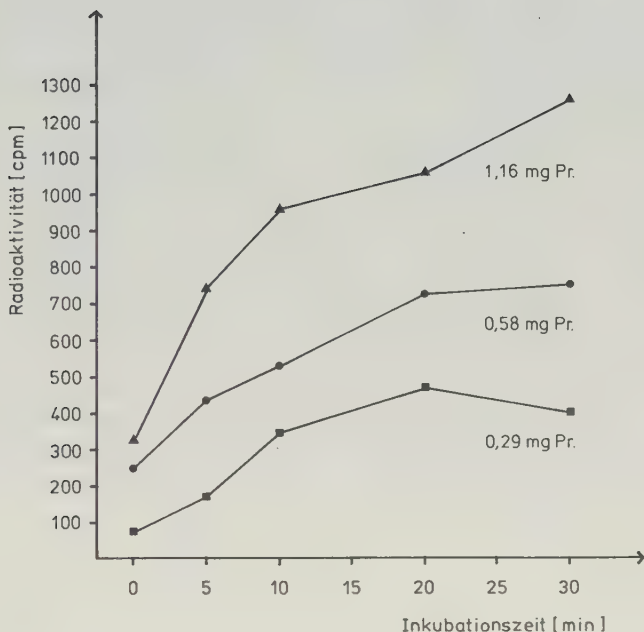
Durch den Einsatz von Zellhomogenaten anstelle von Mikrosomenpräparationen zur Epoxidhydratasemessung wird ein möglicher Störeinfluß durch Enzyme und Cofaktoren der Zytosolfraktion erheblich verstärkt. Besondere Beachtung verdient in diesem Zusammenhang die enzymatische und spontane Konjugation des BP-4,5-oxids mit GSH. Um eine quantitative Aussage über die Bildung von wasserlöslichen Produkten machen zu können, wurde in Fortführung der vorigen Untersuchung (4.1.1.3.4.) nach einer zweiten Äthylacetat-Extraktion mit 2 ml ein 300 µl-Aliquot der DMSO/H₂O-Phase gemessen.

Figur 6 zeigt, daß bereits zur Nullzeit der Inkubation Radioaktivität in die DMSO/H₂O-Phase übergeht und daß sie mit zunehmender Inkubationsdauer und Homogenatmenge ansteigt. In Tabelle 4 wird die Radioaktivität in der DMSO/H₂O-Phase mit der BP-4,5-diol-Bildung quantitativ verglichen. Dabei erwies sich die EH-Aktivität als linear mit Zeit und Protein, obwohl die Größenordnung des Substratverlustes zu wasserlöslichen Produkten der BP-4,5-diol-Bildung vergleichbar ist.

Tabelle 4: Gegenüberstellung der BP-4,5-diol-Bildung in der Äthylacetat-Phase und Radioaktivitätszunahme in der DMSO/H₂O-Phase.

Inkubationsbedingung (Zeit, Protein)	Substratumsatz zum BP-4,5-diol	Substratumsatz zu wasserlöslichen Verbindungen
5 min, 0,29 mg	0,9 %	1,2 %
10 min, 0,58 mg	3,5 %	3,9 %
20 min, 0,58 mg	7,8 %	5,3 %
30 min, 1,16 mg	22,4 %	9,3 %

Die Daten sind in Prozent der zugefügten Substratradioaktivität ausgedrückt.



Figur 6: Messung der DMSO/H₂O-Phase unter den Bedingungen der Epoxidhydratasebestimmung der Reuber-Hepatomzellen. An das Extraktionsschema zur Messung der EH-Aktivität anschließend und einer weiteren Extraktion mit 2 ml Äthylacetat wurde die Radioaktivität eines 300 µl-Aliquots der DMSO/H₂O-Phase gemessen. Als Szintillationsflüssigkeit diente 10 ml Rotiszint 22. In der Graphik aufgetragen sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

4.1.1.4. Die pH-Abhängigkeit der EH-Aktivität im
Reuber-Hepatomzellhomogenat

Die Pufferlösungen wurden bei Zimmertemperatur hergestellt. Im einzelnen waren es:

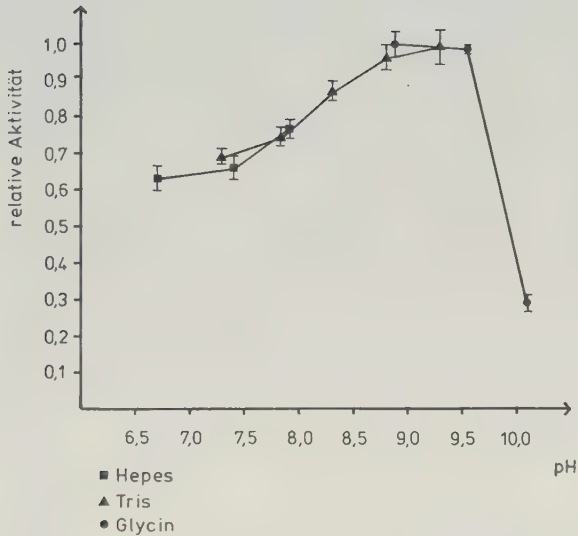
0,5 M Hepespuffer pH: 7,0 , 7,5 und 8,0

0,5 M Trispuffer pH: 7,5 , 8,0 , 8,5 , 9,0 und 9,5

0,25 M Glycinpuffer pH: 9,0 , 9,5 und 10,0

Da die Pufferkonzentrationen in der Inkubationslösung nur 1/5 der eingestellten Stammlösungen betrug und eine zusätzliche pH-Verschiebung durch das Zellprotein zu beobachten war, wurden die pH-Werte in der endgültigen Inkubationslösung bei 37°C nachgemessen. Auf diese Daten wurde die Epoxidhydratase-Aktivität in der Figur 7 bezogen.

Für die weiteren Epoxidhydratasemessungen wurde eine 0,5 M Trispuffer-Stammlösung pH 9,5 benutzt. Dies ergibt einen leicht niedrigeren pH-Wert in der Inkubationslösung, der im pH-Optimum des Enzyms (9,0 bis 9,5) liegt.



Figur 7: PH-Abhängigkeit der EH-Aktivität in Reuber-Hepatomzellhomogenaten. Die relative Aktivität ist ausgedrückt in Abhängigkeit von den pH-Werten, die in den kompletten Inkubationsmischungen bei 37°C gemessen wurden. Die einzelnen Meßpunkte repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 bis 6 Bestimmungen. Es wurden 0,44 mg und 0,88 mg Protein eingesetzt.

4.2. Messung der EH-Aktivität in verschiedenen Zellkulturlinien

Das erarbeitete Verfahren (4.1.1.) wurde zur Messung der EH-Aktivität auf Zellarten unterschiedlicher Herkunft übertragen. Die Auswahl enthält Zellen von verschiedenen Spezies und schließt sowohl Primärkulturen wie etablierte und nicht etablierte Sekundärkulturen ein. Eine Zelllinie war durch Virustransformation stark entartet.

Trotz dieser Verschiedenheiten zeigten alle Zellen meßbare EH-Aktivität, die allerdings deutlich von Zellart zu Zellart variierte (Tabelle 5).

Die festgestellten Aktivitätsdifferenzen der EH in 3T3-Zellen bei Zelldichten von $30\,000/\text{cm}^2$ und $90\,000/\text{cm}^2$ weisen auf die Bedeutung der Zelldichte und der damit verbundenen Zellteilungsrate zum Zeitpunkt der Ernte hin. Der Zusammenhang zwischen Zelldichte und Aktivität von fremdstoff-metabolisierenden Enzymen in Reuber-Hepatomzellen wurde später im Hinblick auf Induktionsstudien ausführlich untersucht (4.6.1.).

Legende zu Tabelle 5:

Die menschlichen Lymphozyten wurden im Labor von Prof. Lemmel, Institut für Mikrobiologie der Universität Mainz, kultiviert und mit Pokeweed Mitogen stimuliert (Gewinnung und Kulturbedingungen siehe (47)). In Klammern ist die Zahl der gemessenen Kulturen angegeben.

Tabelle 5: Messung der EH-Aktivität im Homogenat verschiedener kultivierter Zellen

Zellcode und -art	Zelldichte bei Ernte [Zellzahl/cm ²]	EH-Aktivität [pmol BP-4,5- diol/mg Pr./min]
WW-1	Humanfibroblasten	164,7 ± 34,2 (6)
PK-1	Sekundärkulturen	87,7 ± 7,9 (5)
HG-7	von verschiedenen Probanden	96,7 ± 15,4 (5)
BHK-21	Etablierte Ham- sternierenzellen	6,0 ± 1,5 (3)
NIH 3T3	Etablierte Maus- fibroblasten	99,4 ± 1,6 (2) 172,0 ± 30,0 (4)
SV-40 NIH 3T3	Virustransfor- mierte Mausfi- broblasten	10,0 - 20,0 (6)
	Stimulierte men- schliche Lympho- zyten (Primär- kultur)	4,2 ± 0,8 (6)
H-4-II-E	Etablierte Ratten- hepatomzellen (Reuber-Hepatom)	230,2 ± 13,4 (4)

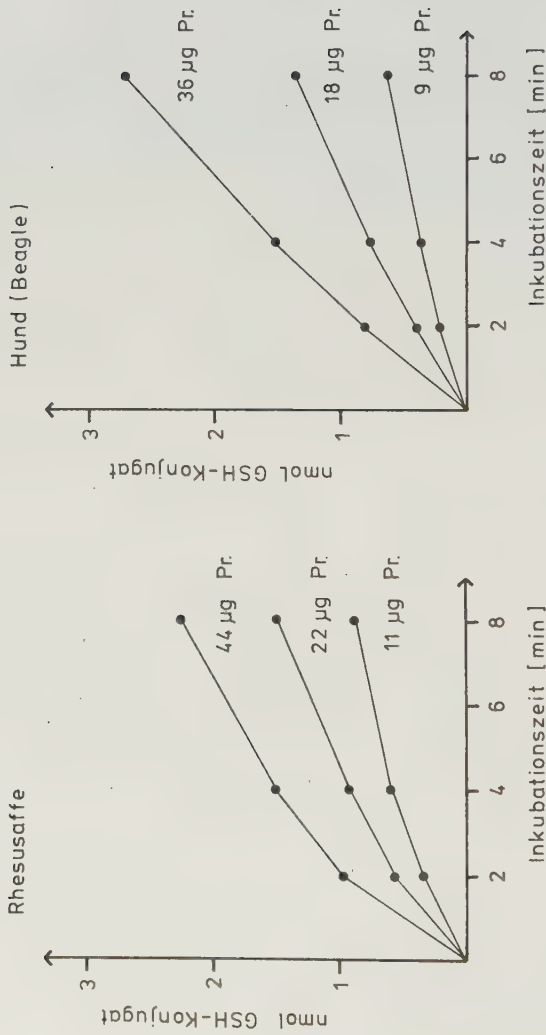
4.3. Tierexperimentelle Vorstudien zur Messung und Induktion der GSH-S-Transferaseaktivität

4.3.1. Messung und Induktion der GSH-S-Transferaseaktivität mit BP-4,5-oxid als Substrat in verschiedenen Tierspezies

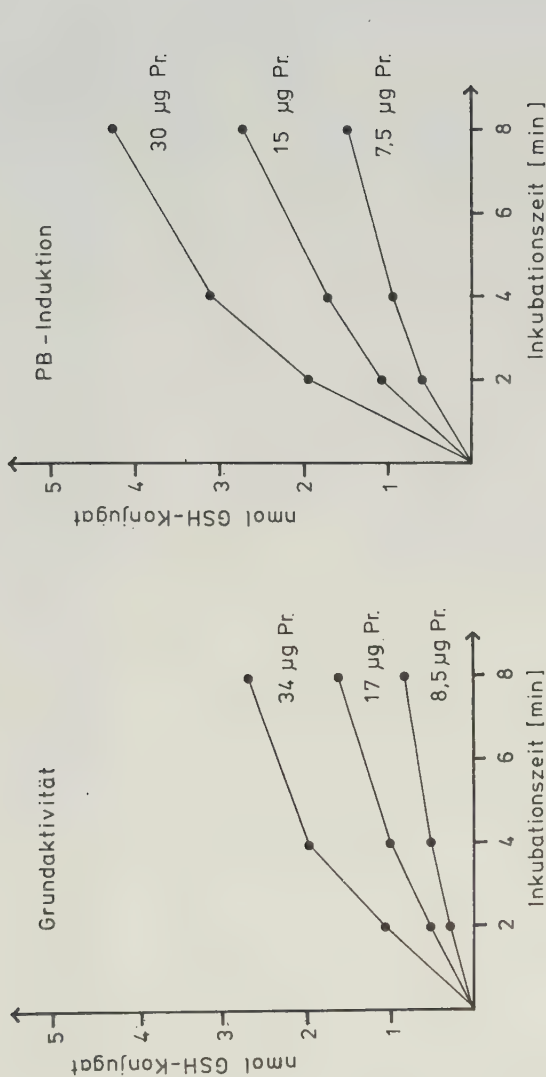
Verschiedene zytosolische und an mikrosomale Membranen assoziierte GSH-S-Transferasen, die trotz ihrer geringen Umsatzgeschwindigkeit wegen ihrer günstigen subzellulären Lage möglicherweise eine besondere Bedeutung für die Inaktivierung von Mutagenen und Karzinogenen haben (21), katalysieren die Konjugation von GSH mit zahlreichen elektrophilen Verbindungen. Um die Enzymaktivitäten auf ihre Wertigkeit zur Protektion der Zelle vor Mutagen- und Karzinogenwirkungen beurteilen zu können, war es wünschenswert zur Messung ein Substrat einzusetzen, das selbst als Mutagen relevant ist. Die Figuren 8 - 13 zeigen die GSHT-Messungen mit BP-4,5-oxid als Substrat im Leberzytosol verschiedener Tierspezies. Die Kurvenverläufe verdeutlichen durch den Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit bei größerer Proteinmenge und längerer Inkubationszeit die Schwierigkeit, die Aktivitäten exakt zu quantifizieren und als Substratumsatz pro Minute und mg Protein auszudrücken. Zudem werden erhebliche Speziesunterschiede in der Protein- und der Zeitabhängigkeit der Reaktion erkennbar. So verläuft die Produktbildung zum Beispiel mit dem Leberzytosol der nicht induzierten NMRI-Maus bis 4 Minuten mit 95 % der initialen Reaktionsgeschwindigkeit in der dritten bis vierten Minute nahezu linear mit Zeit und Protein, während bei der Messung des Leberzytosols der Rhesus-Affen von Anfang an keinerlei Linearität zu beobachten ist. Ebenso ist eine Verschlechterung der im Kontrollzytosol von NMRI-Mäusen, Sprague-Dawley- und Fischer-Ratten nahezu linearen Reaktionsverläufen in der Anfangsphase der Inkubationen gegenüber den mit Phenobarbital induzierten Versuchsgruppen festzustellen.

Trotz dieser Schwierigkeit mit der Linearität und deshalb mit einer beschränkten Genauigkeit wurden die ungefähren initialen Reaktionsgeschwindigkeiten der verschiedenen Versuchstiere in der Tabelle 6 untereinander verglichen.

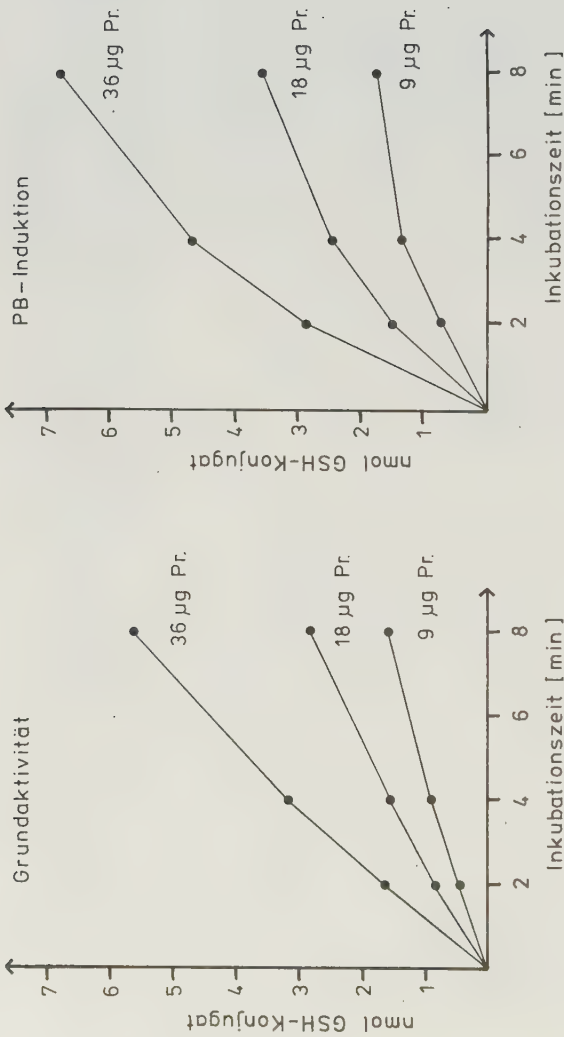
Die GSHT-Aktivität wurde im Leberzytosol aller gemessenen Tierspezies nach PB-Behandlung deutlich gesteigert. Die Induktionen um den Faktor 2 im Leberzytosol der Syrischen Goldhamster und der NMRI-Mäuse sind besonders ausgeprägt. MC zeigt im Leberzytosol der Sprague-Dawley-Ratten keinen wesentlichen Effekt.



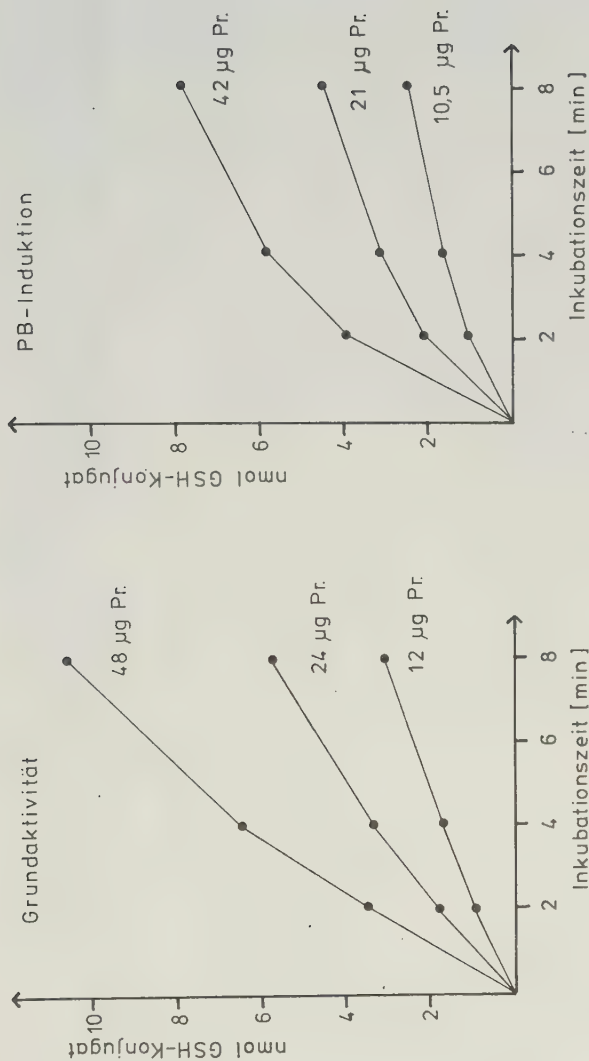
Figur. 8: GSHT-Aktivität im Leberzytosol von Rhesus-Affen und Beagle-Hunden mit BP-4,5-oxid als Substrat. Die Punkte repräsentieren Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.



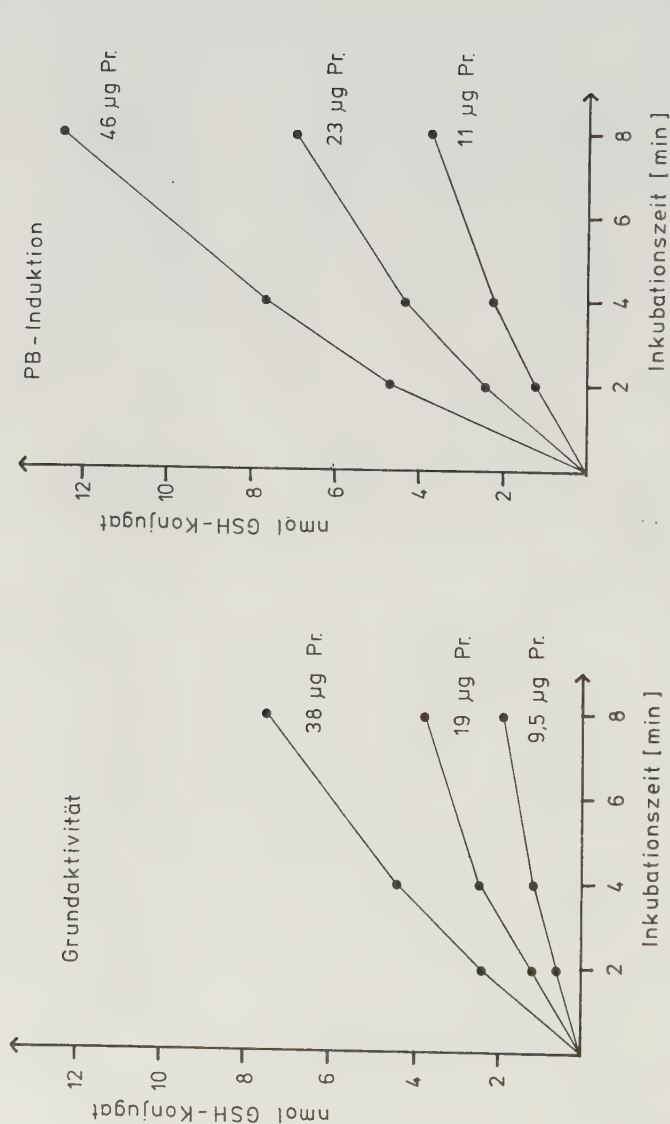
Figur 9: GSHT-Aktivität im Leberzytosol von Kontrollen und PB-behandelten männlichen Syrischen Goldhamster mit BP-4,5-oxid als Substrat. PB (80 mg/kg Körpergewicht oder nur physiologische Kochsalzlösung wurde 72, 48 und 24 h vor dem Töten intraperitoneal gespritzt. Zur Messung wurde ein Pool aus 3 Tieren hergestellt.



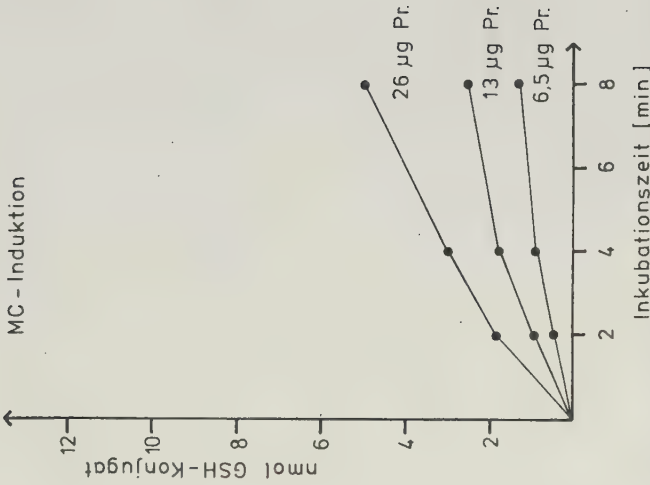
Figur 10: GSHT-Aktivität im Leberzytosol von Kontrollen und PB-behandelten männlichen NMRI-Mäusen mit BP-4,5-oxid als Substrat. PB (80 mg/kg Körpergewicht) oder nur das Lösungsmittel, physiologische Kochsalzlösung, wurde 72, 48 und 24 h vor dem Töten intraperitoneal gespritzt. Zur Messung wurde ein Pool aus 3 Tieren hergestellt.



Figur 11: GSHT-Aktivität im Leberzytosol von Kontrollen und PB-behandelten männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit BP-4,5-oxid als Substrat. PB (80 mg/kg Körpergewicht) oder nur physiologische Kochsalzlösung wurde 72, 48 und 24 h vor dem Töten intraperitoneal gespritzt. Zur Messung wurde ein Pool aus 3 Tieren hergestellt.



Figur 12: GSHT-Aktivität im Leberzytosol von Kontrollen und PB-behandelten männlichen Fischer-Ratten mit BP-4,5-oxid als Substrat. PB (80 mg/kg Körpergewicht) oder nur physiologische Kochsalzlösung wurde 72, 48 und 24 h vor dem Töten intraperitoneal gespritzt. Zur Messung wurde ein Pool aus 3 Tieren hergestellt.



Figur 13: GSHT-Aktivität im Leberzytosol von MC-behandelten männlichen Fischer-Ratten mit BF-4,5-oxid als Substrat. MC (10 mg/kg Körpergewicht) in Sonnenblumenöl wurde als einmalige Gabe 3 Tage vor dem Töten intraperitoneal gespritzt. Zur Messung wurde ein Pool aus 3 Tieren hergestellt.

Tabelle 6: Grundaktivitäten und Induktion der zytosolischen GSH-S-Transferaseaktivität im Leberzytosol verschiedener Tierspezies gemessen mit BP-4,5-oxid als Substrat

Spezies	Induktor	Spez. Aktivität [nmol GSH-Konjugat/mg Pr./min]
Affe I	--	15,0
Affe II	--	12,3
Affe III	--	13,8
Hund I	--	11,7
Hund II	--	11,9
Hund III	--	11,3
Fischer-Ratte	--	32,1
Fischer-Ratte	MC	36,9
Fischer-Ratte	PB	52,2
Sprague-Dawley-Ratte	--	37,9
Sprague-Dawley-Ratte	PB	51,7
Hamster	--	16,5
Hamster	PB	36,7
NMRI-Maus	--	22,6
NMRI-Maus	PB	43,3
CF-1-Maus	--	33,3
CF-1-Maus	PB	41,7

Die Grundaktivitäten der GSH-S-Transferasen der Rhesus-Affen und Hunde (Beagle) wurden in Leberzytosolpräparationen von Einzeltieren bestimmt. Alle anderen angegebenen Werte stammen aus dem gepoolten Leberzytosol von jeweils drei Tieren. Als Basis für die Berechnung dienten Inkubationen bei 2 min und mit 9 µg bis 12 µg Protein, deren enzymatische Produktbildung mindestens dem doppelten radioaktiven Blindwert entsprach.

PB: Intraperitoneale Gabe von Phenobarbital (80 mg/kg

Körpergewicht) in 0,9 %iger NaCl 1, 2 und 3 Tage vor dem Töten der Tiere, letzte Injektion 24 Stunden vor der Organpräparation.

MC: Die Tiere erhielten eine einmalige intraperitoneale Gabe von 3-Methylcholanthren (10 mg/kg Körpergewicht) in Sonnenblumenöl 3 Tage vor dem Töten.

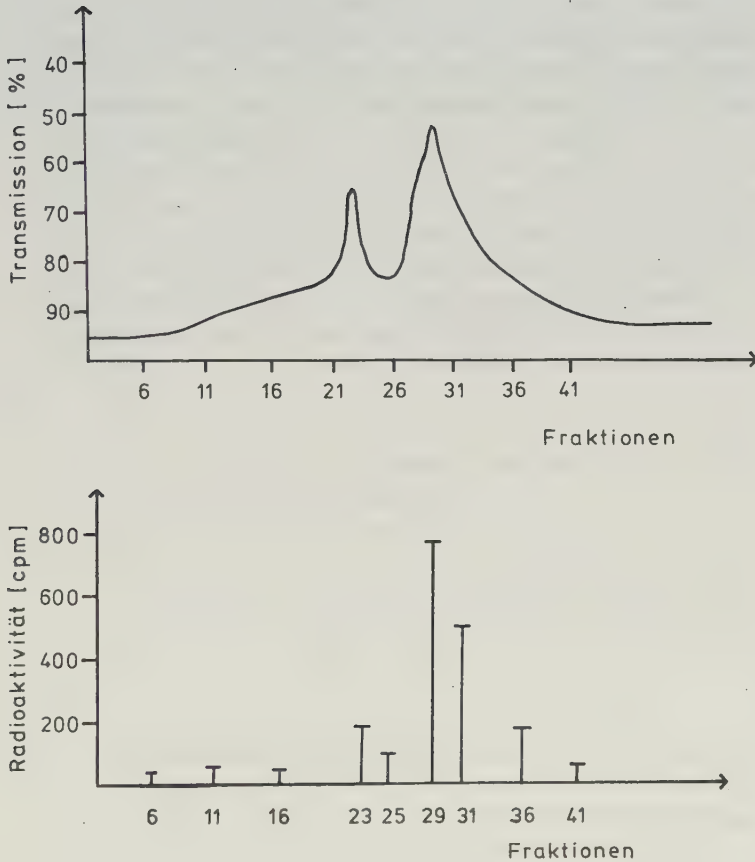
4.3.2. Nachweis der Produkthemmung der GSH-S-Transferase-Reaktion durch das BP-4,5-oxid-GSH-Konjugat

4.3.2.1. Herstellung von BP-4,5-oxid-GSH-Konjugat

Das Konjugat wurde durch Inkubation des (^3H)-BP-4,5-oxids mit dem Leberzytosol von Sprague-Dawley-Ratten (25 mg Protein/ml) hergestellt. Es wurden vier Inkubationen mit 10 ml 5 mM GSH in 0,05 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,5, 200 μl Leberzytosol ($\approx$ 5 mg Protein) und 1 μmol (^3H)-BP-4,5-oxid angesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C folgte die zweifache Extraktion mit 15 ml Äthylacetat und das Einengen der vereinigten wässrigen Phasen durch Vakuumverdampfung auf 7 ml. Davon wurden 3,5 ml auf eine Sephadex-G 25-Säule (30 cm x 1 cm) aufgetragen, mit Wasser als Laufmittel chromatographiert und in 3 ml-Fractionen aufgefangen. Mit einer UV-Lampe wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm durch Registrierung auf einem Direktschreiber die UV-Absorption des Eluats verfolgt (Figur 14). Die Charakterisierung der Fractionen 23 und 29 durch ein UV-Spektrum ergab für die Fraction 23 ein allmähliches Ansteigen der Absorption von 320 nm bis 250 nm ohne Vorbandenmaxima, worauf ein Gipfel zwischen 230 nm und 200 nm folgte, und für die Fraction 29 Vorbandenmaxima bei 326 nm, 312 nm und 300 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 275 nm. Die Fraction 29 enthielt somit das BP-4,5-oxid-GSH-Konjugat, das, wie erwartet, mit geringen Verschiebungen eine dem BP-4,5-dihydrodiol ähnliche (46) UV-Absorptions-

kurve aufwies.

Die zusammengefaßten Fraktionen 27 bis 32 wurden auf dem Rotationsverdampfer (37°C , Vakuum) auf 2 ml eingeeengt. Darauf folgte die portionsweise Dünnschichtchromatographie auf Silicagel-Platten mit dem Laufsystem n-Butanol, n-Propanol und 2 M NH_3 im Volumenverhältnis 2:1:1 (48). Die Bande, die das Konjugat enthielt, wurde durch UV-Fluoreszenz, Kopplung mit Ninhydrin und durch einen Radioaktivitätsgipfel auf der Platte lokalisiert. Das Konjugat wurde mit Wasser vom Silikagel eluiert. Ein Kontroll-UV-Spektrum zeigte dieselben Charakteristika wie das der Fraktion 29. Der molare dekadische Extinktionskoeffizient im Lösungsmittel Wasser wurde bei 275 nm mit $7,5 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ermittelt.



Figur 14: Chromatographische Auftrennung der Produkte einer Inkubation von (^3H)-BP-4,5-oxid mit Leberzytosol und GSH. Die obere Kurve zeigt die UV-Absorption bei 254 nm des Eluats von einer Sephadex G-25-Säule, die untere Kurve die Radioaktivität von ausgewählten Fraktionen. Es wurde ein 20 μl -Aliquot von den 3 ml-Fractionen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit, Rotiszint 22, gemessen.

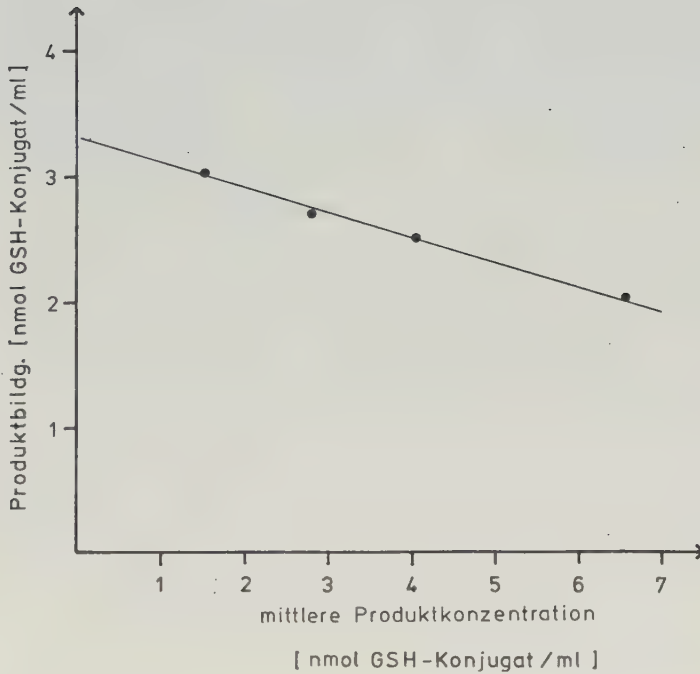
4.3.2.2. Messung der GSH-S-Transferaseaktivität mit BP-4,5-oxid als Substrat unter definierter Produktzugabe

Zur Untersuchung der Produkthemmung wurde unter Standardbedingungen 2 Minuten lang mit stets der gleichen Leberzytosolmenge (Sprague-Dawley-Ratte) inkubiert. Aus der Tabelle 7 wird eine Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Produktkonzentration in der Inkubationsmischung ersichtlich. Als spezifische Aktivität der GSH-S-Transferasen im Rattenleberzytosol läßt sich bei dieser Untersuchung aus dem Umsatz bei 2 Minuten ohne Produktvorgabe 47,0 nmol/mg Protein/min errechnen. Durch Extrapolation gegen den Nullwert der Produktkonzentration läßt sich eine initiale Reaktionsgeschwindigkeit von 50,3 nmol/mg Protein/min ermitteln (Figur 15).

Tabelle 7: Wirkung von Produktzugabe auf die Aktivität der zytosolischen GSH-S-Transferasen mit BP-4,5-oxid als Substrat

Produktvorgabe [nmol ml]	Substratumsatz [nmol]
0	3,10
1,38	2,71
2,77	2,54
5,54	2,12

Inkubationszeit 2 min, Proteinzugabe 33 µg, BP-4,5-oxid-GSH-Konjugat aus der beschriebenen Präparation (4.3.2.1.). Die Substratkonzentration war 110 µM. Der Substratumsatz wurde als Mittelwert aus Doppelbestimmungen errechnet, deren Standardabweichungen kleiner als 5 % vom Mittelwert waren.



Figur 15: Substratumsatz des BP-4,5-oxids in Abhängigkeit von der Produktkonzentration. Inkubationszeit 2 min, Inkubationsvolumen 1 ml, Proteinzugabe 33 µg. Die mittlere Produktkonzentration wurde aus Produktvorgabe und halber (enzymatischer + nicht enzymatischer) Produktbildung errechnet. Nach der Methode „der kleinsten Abstandsquadrate“ wurde aus den Wertepaaren die Regressionsgerade : $y_R = -0,185 x + 3,32$ errechnet.

4.3.3. Induktion der zytosolischen und mikrosomalen GSH-S-Transferasen im Tierversuch

Die Entdeckung einer an mikrosomale Membranen assoziierten GSHT-Aktivität (22), führte zur Frage, wie sich die Induzierbarkeit dieser Enzyme im Vergleich zu den zytosolischen GSH-S-Transferasen verhält. Diese subzellulär verschiedenartig lokalisierten Enzymaktivitäten werden im 100 000 g-Überstand und in den durch eine zweite Zentrifugation nach Resuspension in 150 mM KCl gewaschenen Mikrosomen der Lebern von Balb/c-Mäusen und Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Die zytosolische GSH-S-Transferaseaktivität ließ sich in Balb/c-Mäusen sowohl mit Phenobarbital (Induktionsfaktor: 1,95) als auch mit 3-Methylcholanthren (Induktionsfaktor: 1,53) signifikant induzieren, während in den gewaschenen Mikrosomen keine statistisch sichere Erhöhung der GSH-S-Transferaseaktivität gefunden wurde. β -Naphthoflavon zeigte weder in der Zytoplasma- noch in der Mikrosomenfraktion einen positiven Effekt (Tabelle 8). Bei Sprague-Dawley-Ratten bewirkte Phenobarbital in mehreren Experimenten bei verschiedenen Induktionszeiten eine deutliche Induktion der zytosolischen Aktivität (Induktionsfaktor: 1,24 - 1,63), jedoch war die GSH-S-Transferaseaktivität in der mikrosomalen Fraktion der behandelten Tiere nur 15 % bis 20 % gegenüber den Kontrollen erhöht.

Die Überprüfung dieser Befunde mit einer größeren Tiergruppe unter Verwendung des Substrates 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol zur Messung der GSH-S-Transferasen ergab eine statistisch hoch signifikante Induktion (Induktionsfaktor: 2,01) für die zytosolische, jedoch keine Änderung der mikrosomalen Aktivität.

Tabelle 8: Induktion der zytoplasmatischen und mikrosomalen GSH-S-Transferaseaktivität in den Lebern von Balb/c-Mäusen

Präparation	Induktor	Behandlungstage [Tage vor Tod]	Kontrollaktivität $\left[\frac{\text{nmol GSH-Konj.}}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}} \right]$	Aktivität nach Induktion $\left[\frac{\text{nmol GSH-Konj.}}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}} \right]$	Induktions- faktor	Signi- fikanz Test
Zytoplasma Mikrosomen	PB	8 - 1	$19,0 \pm 2,3$ (3)	$37,0 \pm 5,2$ (4)	1,95	$p < 0,005$
	PB	8 - 1	$0,66 \pm 0,05$ (3)	$0,78 \pm 0,1$ (4)	1,18	n.s.
Zytoplasma Mikrosomen	MC	8 , 4	$20,3 \pm 1,6$ (3)	$31,0 \pm 4,3$ (5)	1,53	$p < 0,005$
	MC	8 , 4	$0,61 \pm 0,06$ (3)	$0,52 \pm 0,08$ (5)	0,85	n.s.
Zytoplasma Mikrosomen	BNF	8 , 4	$17,0 \pm 2,1$ (3)	$17,6 \pm 2,4$ (5)	1,04	n.s.
	BNF	8 , 4	$0,71 \pm 0,08$ (3)	$0,70 \pm 0,06$ (5)	0,99	n.s.

Männliche, 20 - 25 g schwere Mäuse erhielten an den in der Tabelle angegebenen Tagen je eine intraperitoneale Injektion von 80 mg/kg Körpergewicht Phenobarbital (in 0,9 % NaCl), 3-Methylcholanthren (in Sonnenblumenöl) oder β -Naphthoflavon (in Sonnenblumenöl). Kontrolltiere wurden mit den entsprechenden Lösungsmitteln behandelt. Die Werte sind Mittel und Standardabweichungen der Aktivität von 3 bis 5 Tieren, wie durch die Zahlen in Klammern angegeben.

Tabelle 9: Induktion der zytoplasmatischen und mikrosomalen GSH-S-Transferaseaktivität mit Phenobarbital in den Lebern von Sprague-Dawley-Ratten

Messung mit dem Substrat (^3H)-BP-4,5-oxid						
Präparation	Induktionszeit [Tag]	Kontrollaktivität $\left[\frac{\text{nmol GSH-Konj.}}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}} \right]$	Aktivität nach Induktion $\left[\frac{\text{nmol GSH-Konj.}}{\text{mg Protein} \cdot \text{min}} \right]$	Induktions- faktor	Signifikanz T-Test	
Zytoplasma gew. Mikrosomen	8	43,0 Pool aus	70,0 Pool aus	1,63	--	
	8	0,95 3 Tieren	1,1 3 Tieren	1,16	--	
Zytoplasma gew. Mikrosomen	3	34,0 $\pm$ 2 (3)	42,0 $\pm$ 1 (3)	1,24	p < 0,005	
	3	1,0 $\pm$ 0,1 (3)	1,2 $\pm$ 0,1 (3)	1,20	p < 0,05	
Messung mit dem Substrat 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol						
Zytoplasma gew. Mikrosomen	8	1095 $\pm$ 68 (6)	2179 $\pm$ 377 (6)	2,01	p < 0,0005	
	8	77,4 $\pm$ 45 (6)	80,2 $\pm$ 9,1 (5)	1,04	n.s.	

Männliche, 200 - 250 g schwere Sprague-Dawley-Ratten erhielten während der angegebenen Induktionszeit täglich eine intraperitoneale Injektion von 80 mg/kg Körpergewicht Phenobarbital in 0,9 % NaCl. Die letzte Injektion wurde 24 Stunden vor dem Töten der Tiere gegeben. Die Kontrolltiere wurden nur mit 0,9 % NaCl behandelt. Die Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen der in Klammern angegebenen Tierzahl.

Legende zu Tabelle 8 und 9:

Enzymmessungen: Für das Substrat (^3H)-BP-4,5-oxid.

Inkubationszeit 2 bis 4 Minuten für die zytoplasmatische und 4 bis 8 Minuten für die mikrosomale GSH-S-Transferaseaktivität. Zur Bestimmung der Aktivität eines Präparates wurden Doppelbestimmungen bei wenigstens zwei Proteinkonzentrationen durchgeführt. Als Berechnungsgrundlage wurden die Umsätze bei den niedrigen Proteinzugaben herangezogen, deren Radioaktivitätszählung mindestens das Zweifache des Blindwertes ausmachte.

Für das Substrat 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol.

Die Produktbildung der enzymatischen GSH-Konjugation wurde photometrisch verfolgt (siehe 3.6.4.3.) und in Doppelbestimmungen bei zwei Proteinkonzentrationen und streng linearen Bedingungen gemessen.

n.s. = nicht signifikant, $p > 0,05$

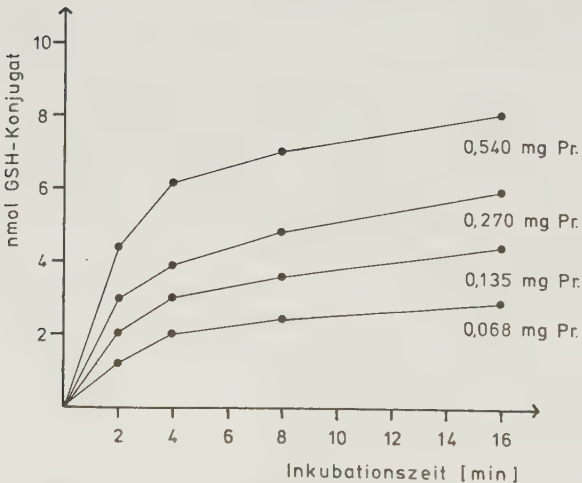
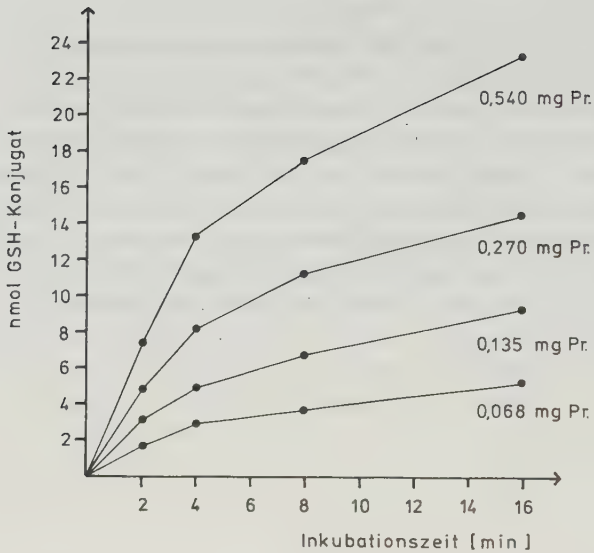
4.4. Messung der GSH-S-Transferaseaktivität in
Reuber-Hepatomzellen

4.4.1. Bestimmung der GSH-S-Transferaseaktivität mit
dem Substrat BP-4,5-oxid

Tierexperimentelle Vergleichsstudien machten methodische Schwierigkeiten bei der Messung der GSH-S-Transferaseaktivität mit dem Substrat BP-4,5-oxid deutlich (4.3.). Dennoch sollte untersucht werden, inwieweit die Meßmethodik mit dem für die Mutagenese und Karzinogenese relevanten Substrat zur Bestimmung der GSH-S-Transferaseaktivität in Reuber-Hepatomzellen anwendbar ist.

Um den Blindwert II (3.6.4.2.), der die an Makromoleküle gebundene Radioaktivität repräsentiert, möglichst klein zu halten, wurden nach optimaler Ultraschallhomogenisierung (4.1.1.2.) größere Zellfragmente (z.B. Membranbruchstücke und Kerne) durch Zentrifugation bei 10 000 g entfernt. Die Abhängigkeit der Produktbildung von der Inkubationszeit und der Proteinzugabe wurde bei zwei GSH-Konzentrationen 5 mM und 0,5 mM unter den bei 3.6.4.2. beschriebenen Bedingungen untersucht. Aus der Darstellung der oberen Kurve der Figur 16 ist ein deutlicher Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit mit längerer Inkubationszeit und mit höherer Proteinzugabe ersichtlich. Betrachtet man die Produktbildung bei 0,068 mg Protein, so sinkt die Rate der Produktbildung gegen Ende der 4. Inkubationsminute auf 75 % und gegen Ende der 16. Inkubationsminute auf 28 % der initialen Reaktionsgeschwindigkeit. Der untere Teil der Figur 16 zeigt eine weitere Verschlechterung der Linearität mit Zeit und Protein unter Verwendung einer 0,5 mM GSH-Konzentration in der Inkubationsmischung. Je länger die Inkubationszeit und je höher die Proteinzugabe desto höher wird der Quotient aus Produktbildung bei 5 mM GSH und bei 0,5 mM GSH (Tabelle 10). Da der Blindwert II (siehe 3.6.4.2., Inkubation mit Puffer, (³H)-BP-4,5-oxid, Protein, ohne GSH) mit 49 % bis 91 % für

die Inkubation mit 5 mM GSH und mit 71 % bis 97 % für die Inkubation mit 0,5 mM GSH jeweils den prozentual größeren Anteil am Gesamtblindwert ausmachte, konnte durch eine Senkung der GSH-Konjugation auf 0,5 mM über die Verminderung der Spontankonjugation keine Sensivitätssteigerung der Messung unter der Bedingung eines submaximalen GSH-Angebotes erreicht werden (Tabelle 11). Legt man die Produktbildung bei 2 min und 0,068 mg Protein der Inkubation mit 5 mM GSH zugrunde, läßt sich eine initiale Reaktionsgeschwindigkeit von 12,2 nmol/mg Protein/min errechnen.



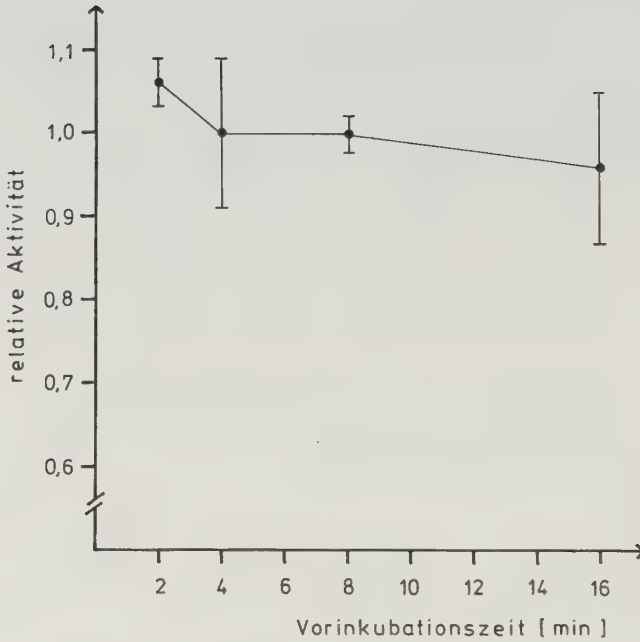
Figur 16: Abhängigkeit der GSHT-Aktivität im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzellhomogenates von der Inkubationszeit und der Proteinzugabe. Vorinkubationszeit 1 min, (^3H)-BP-4,5-oxid-Konzentration 110 μM . Die Punkte repräsentieren Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. In der oberen Kurve ist die Reaktion bei einer GSH-Konzentration von 5 mM und in der unteren von 0,5 mM dargestellt.

Tabelle 10: Vergleich der enzymatischen GSH-Konjugatbildung bei 5 mM und 0,5 mM GSH im Versuchsansatz

	Quotient der Produktbildung bei 5 mM GSH und der bei 0,5 mM			
Proteineinsatz [mg]	Inkubationszeit			
	2 min	4 min	8 min	16 min
0,068	1,38	1,44	1,50	1,90
0,135	1,48	1,57	1,85	2,03
0,270	1,58	2,07	2,32	2,39
0,540	1,72	2,16	2,49	2,87

Tabelle 11: Sensitivität der Messung der GSH-S-Transferaseaktivität im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzellhomogenates

Inkubation		Radioaktivität der Produktbildung in Prozent des Blindwertes	
Zeit [min], Protein [mg]		5 m GSH	0,5 m GSH
2	, 0,068	220	237
4	, 0,135	303	253
8	, 0,270	357	221
16	, 0,540	325	127



Figur 17: Abhängigkeit der GSH-S-Transferaseaktivität im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzell-homogenates von der Vorinkubationszeit des Reaktionsansatzes bei 37°C vor Zugabe des Substrates BP-4,5-oxid. Proteineinsatz: 0,135 mg und 0,27 mg. Inkubationszeit mit Substrat 2 min. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus jeweils 4 Inkubationen gebildet.

4.4.1.1. Abhängigkeit der GSH-S-Transferaseaktivität im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzellhomogenates von der Vorinkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C

Es sollte untersucht werden, ob der gezeigte Abfall der Umsatzgeschwindigkeit (Figur 16) bei längerer Inkubationszeit möglicherweise durch eine Instabilität der GSH-S-Transferasen unter den gewählten Reaktionsbedingungen verursacht wird. Die kompletten Reaktionsansätze wurden vor der Substratzugabe 2 min bis 16 min im Wasserbad bei 37°C vorinkubiert.

Die Figur 17 zeigt einen Aktivitätsabfall von maximal 10 % nach einer Vorinkubationszeit von 16 min. Die Aktivitätsverminderung zwischen dem 8- und dem 16-Minutenpunkt der vorigen Untersuchung (4.4.1., Figur 16) auf ca. 20 % bis 25 % gegenüber der initialen Reaktionsgeschwindigkeit kann dadurch nicht erklärt werden. Da aufgrund dieser Befunde auch bei der GSH-S-Transferasemessung der Reuber-Hepatomzellen eine Produkthemmung angenommen werden kann, wurde wegen des hohen experimentellen Materialaufwandes auf eine Studie der Produkthemmung, wie sie mit den zytosolischen GSH-S-Transferasen der Rattenleber beschrieben wurde (4.3.2.), verzichtet.

4.4.2. Messung der GSH-S-Transferaseaktivität mit den Substraten 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol

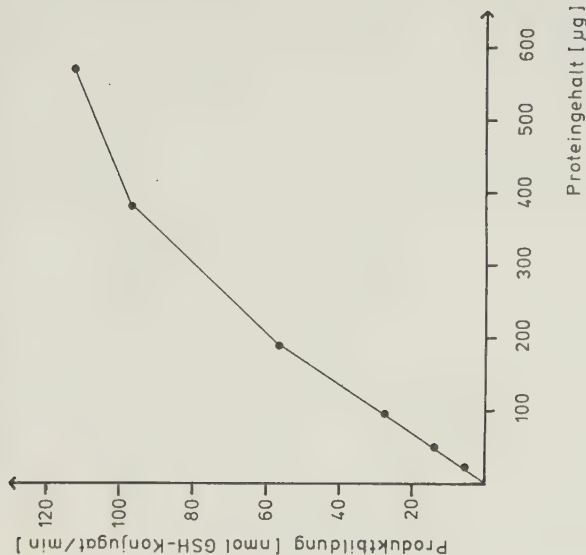
Die aufgezeigten Schwierigkeiten der GSH-S-Transferasemessung mit BP-4,5-oxid (4.4.1.) führten zur Suche nach anderen geeigneten Methoden, Induktionseffekte zu erfassen. Die Messung der GSH-S-Transferasen mit dem Substrat DNCB nach der Methode von Habig et al. (43) des Reuber-Hepatomzellhomogenates zeigte bei einer Bestimmbarkeitsgrenze von 0,5 nmol GSH-Konjugat/mg Protein/min mit Grundaktivitäten

von 300 nmol GSH-Konjugat/mg Protein/min eine hohe Empfindlichkeit und mit einer Zeitlinearität von mindestens 2 bis 3 Minuten und einer Proteinlinearität bis 190 µg Protein (Figur 18) eine gute Quantifizierbarkeit. Dieses Substrat zeichnet sich bei Untersuchungen von reinen GSH-S-Transferasen der Rattenleber (43), die in umgekehrter Reihenfolge der Elution von Carboxymethyl-Cellulose durch einen Ionengradienten mit den Buchstaben A bis E bezeichnet werden, durch eine hohe Aktivität mit den Transferasen AA, A, B, C und D aus, während es durch E vergleichsweise langsam umgesetzt wurde. Da das Substrat 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol nur durch die Transferasen A und C in nennenswertem Umfang umgesetzt wird, eröffnet sich die Möglichkeit, durch Messung der Enzymaktivität mit beiden Substraten bei Änderung der Gesamtaktivität durch Induktionsvorgänge eventuell zwischen den einzelnen Transferasen zu differenzieren.

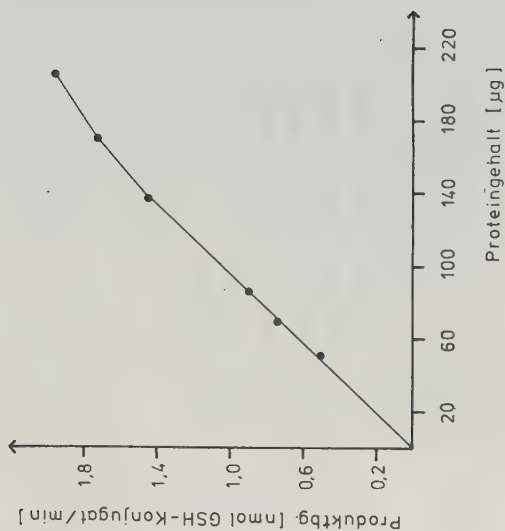
Die Aktivität der GSH-S-Transferasen mit dem Substrat DCNB im 10 000 g-Überstand von Reuber-Hepatoma-Zellhomogenaten von 10 nmol/mg Protein/min war bei einer Bestimmbarkeitsgrenze von 0,2 nmol/mg Protein/min ausreichend hoch. Die Reaktion war mit Zeit bis 12 min und mit Protein bis 140 µg (Figur 19) linear.

Die Untersuchung der K_M -Werte für DNCB und GSH im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatoma-Zellhomogenates (Figuren 20 und 21) verdeutlicht die Existenz verschiedener Transferasen mit unterschiedlicher Affinität zu den Substraten. Für GSH wurden bei konstanter DNCB-Konzentration von 1 mM die K_M -Werte 0,2 mM (wie Rattenleber-Transferase AA, A und B) und 0,1 mM (Rattenleber-Transferase C) gefunden (49). Der erste K_M -Wert für DNCB gleicht mit 0,2 mM keiner der von Jakoby angegebenen Rattenleber-Transferasen, während der zweite Wert mit 0,05 mM der Rattenleber-Transferase A entspricht.

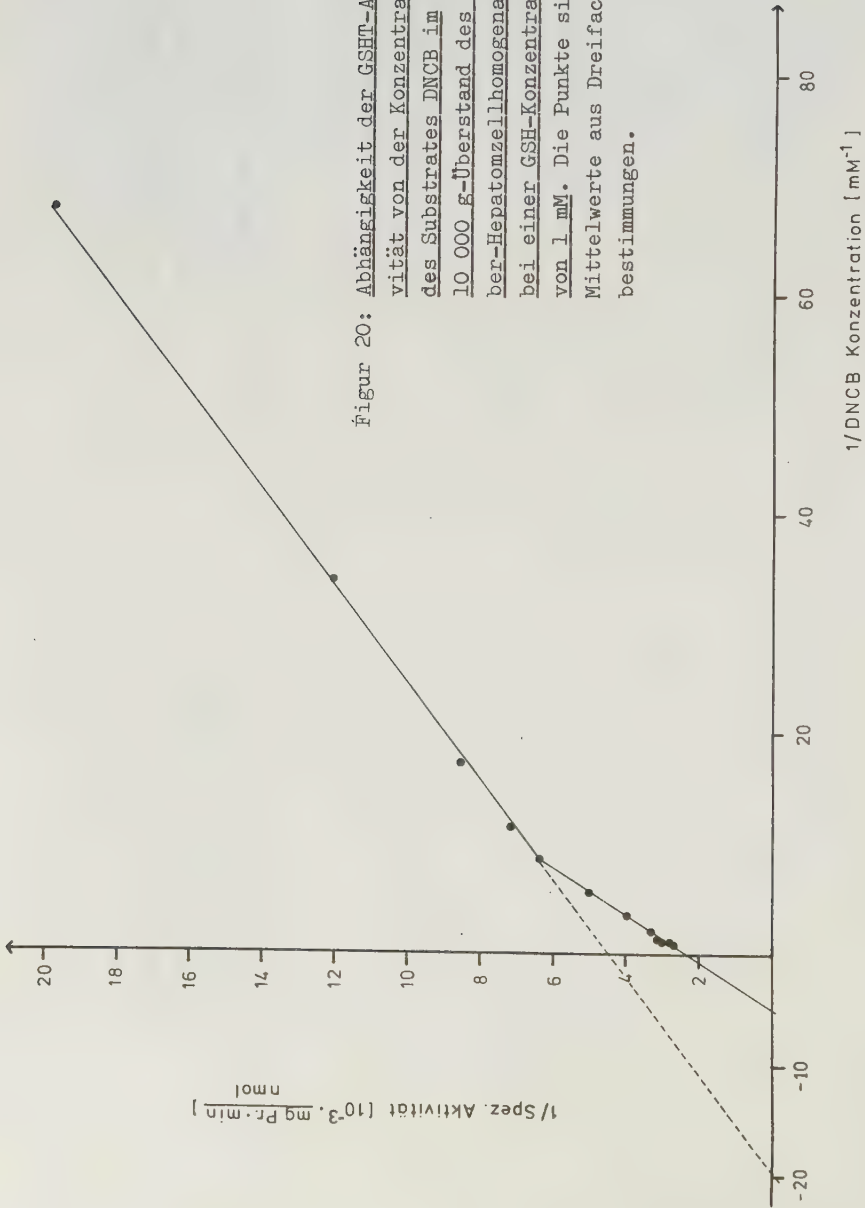
Wie die Figur 22 zeigt, war die GSH-S-Transferaseaktivität über mehrere Tage Lagerung bei -20°C stabil.



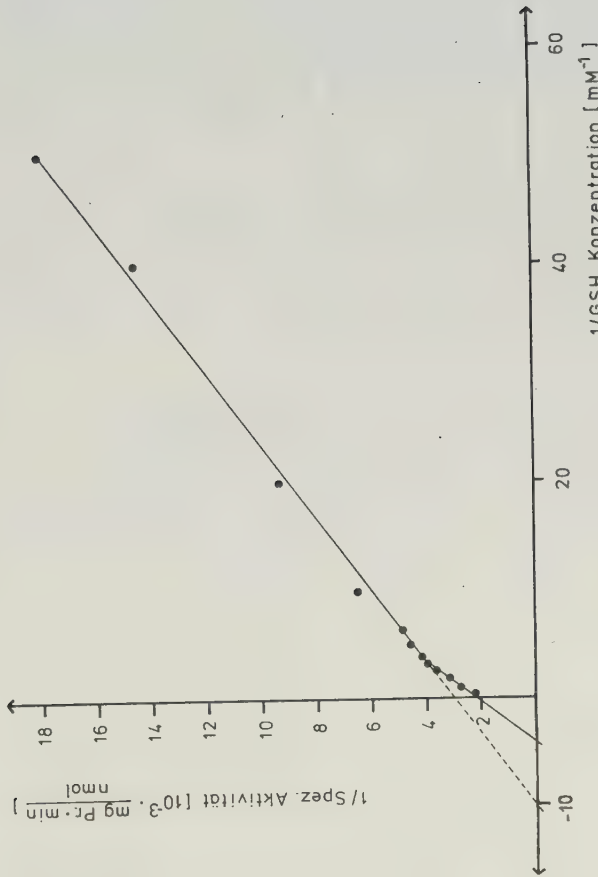
Figur 18: Proteinlinearität der GSHT-Aktivität mit DNCB als Substrat im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzellhomogenates. Abgebildet sind Mittelwerte aus 2 bis 3 Bestimmungen. Die Standardabweichungen waren stets kleiner als 5 % vom Mittelwert.



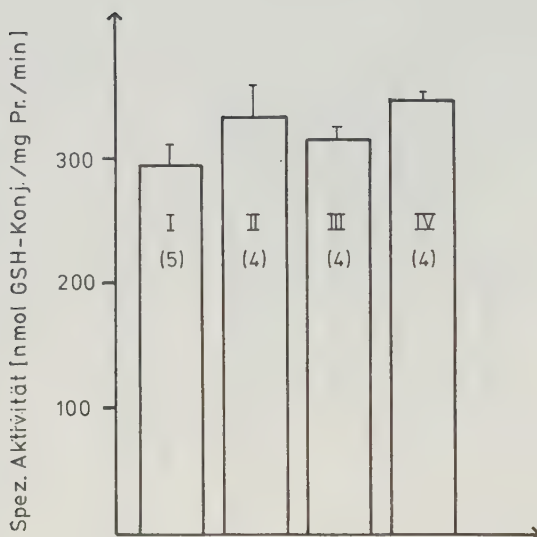
Figur 19: Proteinlinearität der GSHT-Aktivität mit DNCB als Substrat im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzellhomogenates. Abgebildet sind Mittelwerte aus 2 bis 3 Bestimmungen. Die Standardabweichungen waren stets kleiner als 5 % vom Mittelwert.



Figur 20: Abhängigkeit der GSHT-Aktivität von der Konzentration des Substrates DNCB im 10 000 g-Überstand des Reu-ber-Hepatomzellhomogenates bei einer GSH-Konzentration von 1 mM. Die Punkte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.



Figur 21: Abhängigkeit der GSHT-Aktivität im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzell-homogenates von der GSH-Konzentration bei konstanter Konzentration des Substrates DNCE von 1 mM. Die Punkte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.



Figur 22: Einfrierstabilität der GSHT-Aktivität im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzell-homogenates gemessen mit dem Substrat DNCP.
Es wurden die Reuber-Hepatomzellen von vier 150 mm-Kulturschalen (Zelldichte: 70 000 Zellen/cm²) geerntet, ultraschallhomogenisiert, bei 10 000 g zentrifugiert, die Überstände vereinigt und auf vier gleiche Proben aufgeteilt. Die Probe I wurde sofort gemessen. Die übrigen Proben wurden bei -20°C gelagert und aufgetaut:
II: Messung nach 72 Stunden Lagerung
III: Auftauen und wieder einfrieren nach 48 Stunden und Messung nach insgesamt 72 Stunden Lagerung.
IV: Auftauen und wieder einfrieren nach 24 und 48 Stunden und Messung nach insgesamt 72 Stunden Lagerung.
Das Auftauen erfolgte langsam im Eiswasserbad. In Klammern ist die Anzahl der Mehrfachbestimmungen einer Probe angegeben.

4.4.2.1. Nachweis von GSHT-Aktivität in der Mikrosomenfraktion von Reuber-Hepatomzellen

In gewaschenen Mikrosomen von Reuber-Hepatomzellen wurde mit dem Substrat DNCB ein Siebzigstel der GSHT-Aktivität des Zytosols gemessen (Tabelle 12). Mit dem Substrat DNCB konnte in gewaschenen Mikrosomen keine Aktivität nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit der Methode wäre auch nicht ausreichend, entsprechend der Aktivität mit DNCB, ein Siebzigstel der GSHT-Aktivität des Zytosols mit dem Substrat DNCB zu bestimmen.

Tabelle 12: Messung der GSHT-Aktivität in verschiedenen Fraktionen von Reuber-Hepatomzellen

Fraktion	Substrat DNCB spez. Aktivität [nmol GSH-Konjugat/mg Pr./min]	Substrat DNCB spez. Aktivität [nmol GSH-Konjugat/mg Pr./min]
I		
10 000 g-Überstand	198 ± 6	$6,4 \pm 0,4$
Zytosol	360 ± 8	$14,8 \pm 0,8$
gewaschene Mikrosomen	$5,5 \pm 0,7$	nicht bestimmbar ($<0,2$)
II		
10 000 g-Überstand	218 ± 16	$6,6 \pm 0,3$
Zytosol	440 ± 16	$15,4 \pm 1,0$
gewaschene Mikrosomen	$6,6 \pm 1,0$	nicht bestimmbar ($<0,2$)

Die einzelnen Fraktionen sind mit 2 bis 4 Messungen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen bestimmt. Die Werte stellen Mittel und Standardabweichungen dar. I und II bezeichnen zwei getrennte Präparationen.

Es wurden die Zellen von 30 konfluenten Platten geerntet (Dichte: 100 000 - 120 000 Zellen/cm²). Die Zellsuspension

wurde in zwei gleiche Portionen von 15 ml Volumen geteilt, ultraschallhomogenisiert und bei 10 000 g 15 min lang zentrifugiert. Der 10 000 g-Überstand wurde 60 min lang bei 100 000 g zentrifugiert, worauf sich nach Resuspension des Pellets in 6 ml 150 mM KCl noch ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 100 000 g anschloß, dessen Überstand und Pellet als Zytosol und gewaschene Mikrosomen bezeichnet sind.

4.5. Messung der Monooxygenaseaktivität in Reuber-hepatomzellen

In zahlreichen Arbeiten (34 - 36) mit Zellkulturen wurde die Hydroxylierung des Benzo(a)pyrens gemessen. Die O-Desalkylierung von 7-Äthoxycumarin, die zunächst als direkter fluorometrischer Test zur Messung der Monooxygenase in Lebermikrosomen von Ullrich und Weber (44) entwickelt wurde, erwies sich dank der empfindlichen Produkterfassung ebenfalls als geeignet, Monooxygenaseaktivität in Reuber-Hepatomzellen zu bestimmen. Da zudem einige Befunde darauf hinweisen (50), daß die 7-Äthoxycumarin-Desalkylierung ein breiteres Monooxygenase-Spektrum erfaßt als die Benzo(a)pyren-Hydroxylierung, wurde diese direkte fluorometrische Methode für die Induktionsstudien in dieser Arbeit verwendet.

Die Untersuchung der Ultraschallabhängigkeit der 7-Äthoxycumarin-Desalkylierung durch Reuber-Hepatomzellen (Figur 23) zeigt ein rasches Absinken der Aktivität schon nach kurzer Behandlungsdauer, so daß die Bestimmung der Monooxygenase im Gegensatz zur Epoxidhydratase in den weiteren Versuchsreihen in Ganzzellen durchgeführt wurde. Zur Suspension der Zellen wurde mit 150 mM KCl-Lösung dasselbe Ionenmilieu gewählt wie zur Ultraschallhomogenisierung vor der Epoxidhydratase- und GSH-S-Transferasemessung, um auch bei sehr geringen Proteinausbeuten von einer Zellkulturplatte (1 mg zelluläres Protein) nach der Entnahme eines Aliquots zur Monooxygenasebestimmung die beiden anderen Enzymaktivitäten messen zu können.

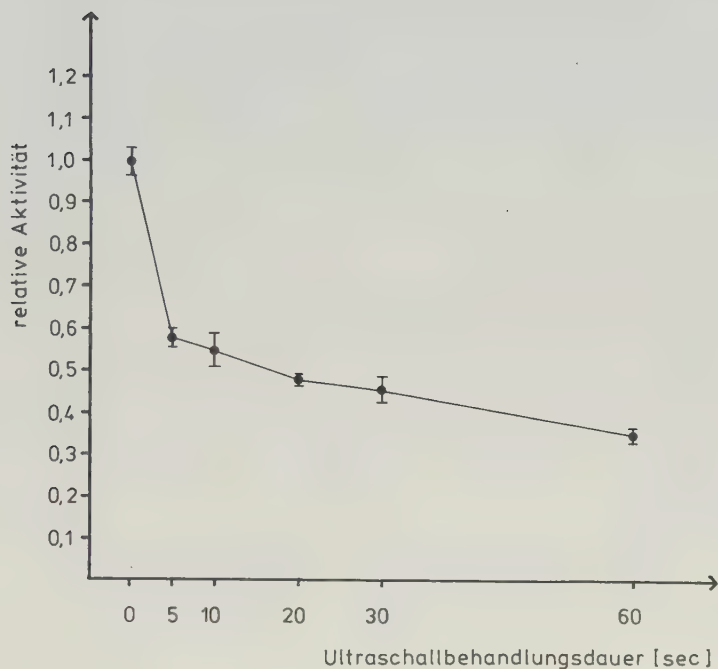
Bei einem Zeitaufwand von 5 bis 15 Minuten für eine Inkubation zogen sich die Messungen einer Probenreihe zuweilen über 6 bis 8 Stunden hin. Die Monooxygenaseaktivität einer frisch hergestellten Zellsuspension war bei Inkubationen mit ausschließlich zelleigenen Cofaktoren 10 bis 25 Prozent niedriger als nach Zusatz von $5 \cdot 10^{-4}$ M NADPH mit einem regenerierenden System, bestehend aus 10^{-3} M Glukose-6-Phosphat und 0,42 U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

Nach achtstündiger Lagerung der Zellsuspension im Eisbad vergrößerte sich die Differenz zwischen den Aktivitätsbestimmungen mit und ohne Cofaktorzusatz auf 30 bis 50 Prozent, wobei die enzymatischen Umsatzraten mit dem Cofaktorzusatz während dieser Lagerzeit stabil blieben. Um Einflüsse der Verschiebungen von Enzymen und Cofaktoren zwischen den intra- und extrazellulären Kompartimenten des Reaktionsansatzes auf die Aktivität der 7-Äthoxycumarin-O-Desalkylierung auf ein vernachlässigbares Maß zu vermindern, wurde bei allen Meßreihen NADPH und ein regenerierendes System zugefügt.

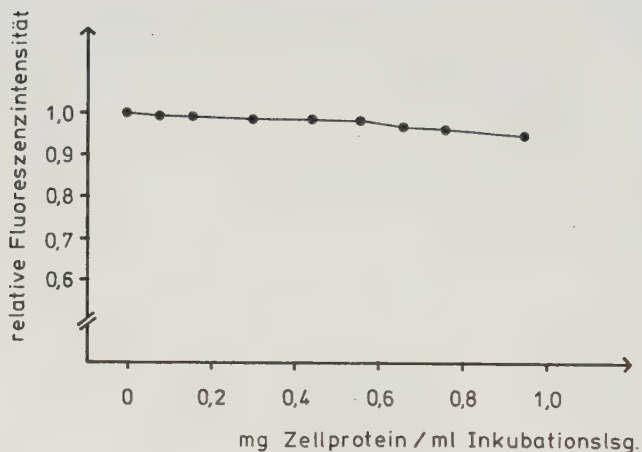
Die intrazelluläre Lokalisation der Reaktion machte die Bestimmung des wirklichen pH-Optimums technisch unmöglich. Da die Fluoreszenzintensität des Produktes mit steigendem pH-Wert zunimmt, wurde in Anlehnung an die Untersuchung von Scharf und Ullrich (51) der niedrigen Monooxygenaseaktivität der Dünndarmhomogenate von Mäusen ein auf den pH-Wert 7,9 eingestellter Phosphatpuffer in die Inkubationsmischung eingesetzt. Unter diesen Bedingungen lag die Meßbarkeitsgrenze bei 0,1 pmol 7-Äthoxycumarin-Bildung/mg zelluläres Protein/min.

Die Auslöschung der Produktfluoreszenz durch die Trübung des zellulären Proteins bekam erst zwischen 0,7 mg und 1 mg mit 3 bis 5 Prozent praktische Bedeutung (Figur 24), so daß bis 0,64 mg Proteinzugabe in die Inkubation die Reaktion mit Protein linear verlief (Figur 25). Die Zeitlinearität konnte für 10 bis 15 Minuten auf dem Direktschreiber verfolgt werden.

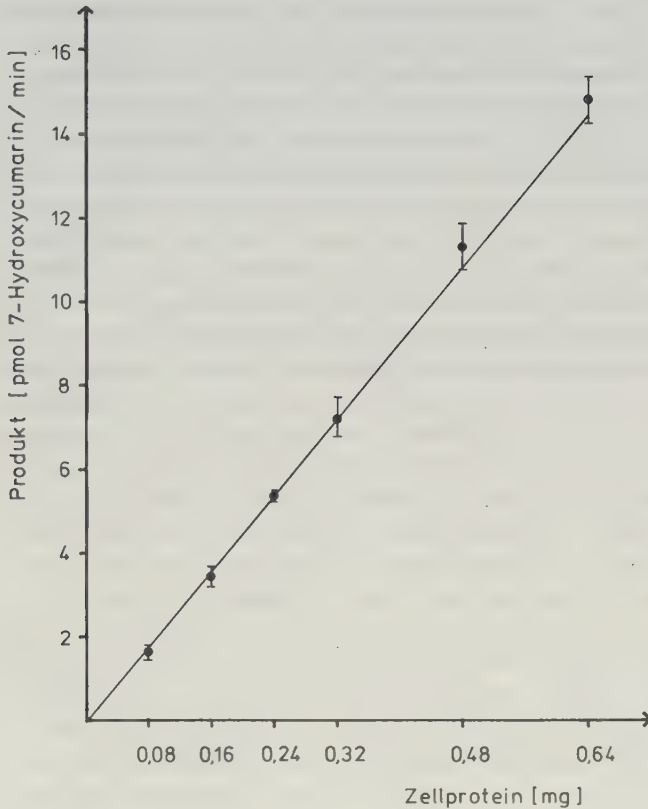
Die aufgezeichneten Kurven wurden bei der Messung jeder Probenreihe mit einer bekannten Menge 7-Hydroxycumarin kalibriert.



Figur 23: Abhängigkeit der Monooxygenaseaktivität in Reuber-Hepatomzellen von der Ultraschallbehandlungsdauer. Die Zellen von sechs 150 mm-Zellkulturplatten wurden gepoolt, auf 6 gleiche Proben aufgeteilt und mit der Nadelsonde eines 300 S Sonicators (Fa. Braun-Melsungen) bei 60 % der maximalen Intensität unter Kühlung im Eiswasserbad ultraschallbehandelt. Behandlungsperioden über 10 sec wurden zum Schutz der Sonde vor Erhitzung in 10 sec-Intervalle unterteilt. Die abgebildeten Mittelwerte und Standardabweichungen sind aus 5- bis 7-Fachbestimmungen errechnet.



Figur 24: Minderung der gemessenen Produktfluoreszenz durch die zellproteinbedingte Inkubationstrübung.
Eine konstante Produktmenge (50 pmol 7-Hydroxycumarin) wurde dem Standardinkubationsansatz (3.6.4.4.) hinzugefügt und die Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zellproteinzugabe dargestellt.



Figur 25: Abhängigkeit der O-Desalkylierung von 7-Äthoxycoumarin vom Zellproteingehalt, der in die Inkubationsmischung eingesetzten Reuber-Hepatomzellen. Es wurden die Zellen von fünf 150 mm-Zellkulturplatten (Dichte: 60 000 Zellen/cm²) geerntet, in 150 mM KCl aufgenommen und als Ganzzellen in die Inkubation eingesetzt.

4.6. Induktionsstudien der MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomezellen

4.6.1. Zellkulturbedingungen für die Induktionsstudien

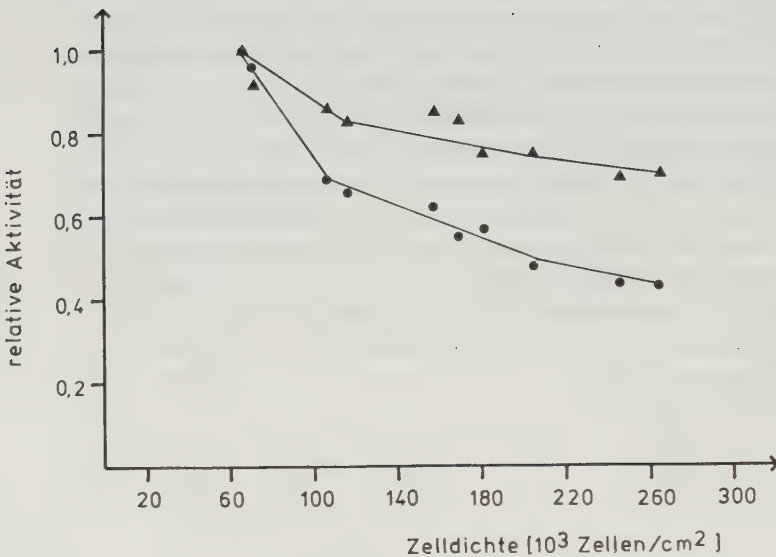
Bereits geringe Veränderungen der Zellkulturbedingungen können zu erheblichen Schwankungen von Enzymaktivitäten führen. Der Einfluß von Serumfaktoren (52) wurde durch Verwendung einer gepoolten Charge foetalen Kälberserums für sämtliche Induktionsversuche standardisiert. Im Gegensatz zu Humanfibroblasten (53) wird die Proliferation der Reuber-Hepatomezellen nicht vollständig kontaktinhibiert, sondern sie vermehren sich, nachdem der Plattenboden von einer Einzelzellschicht bedeckt ist, mit verminderter Geschwindigkeit unter Bildung mehrschichtiger Zellhaufen weiter. Somit waren Induktionsstudien unter den Bedingungen der Konfluenz mit dem Vorteil einer hohen Proteinausbeute nicht möglich. Es mußte eine günstige Zeitspanne aus der logarithmischen Wachstumsphase für die Inkubation mit dem Induktor ausgewählt werden. Die Abhängigkeit der MO-, EH- und GSHT-Aktivität von der Zelldichte zum Zeitpunkt der Zellernte von der Platte ist in den Figuren 26 und 27 dargestellt. Der Abfall der MO-Aktivität ist mit zunehmender Dichte deutlicher ausgeprägt als die Verringerung der EH-Aktivität. Die GSHT-Aktivität verhält sich in Abhängigkeit von der Zelldichte am stabilsten. Um von Versuch zu Versuch eine möglichst gleiche Zelldichte vor der Messung der Enzymaktivität zu erreichen, wurde stets nach dem gleichen Ansatzschema verfahren: Plattieren von 10 000 Zellen pro cm^2 , Wechsel des Mediums nach 30 Stunden, Zugabe der Testsubstanz 6 Stunden später und Ernten der Zellen nach einer 18-stündigen Behandlungsperiode, wobei eine Dichte von etwa 70 000 Zellen pro cm^2 erreicht wurde.

Während der logarithmischen Wachstumsphase betrug die Verdoppelungszeit der Reuber-Hepatomezellen 17 ± 1 Stunden. Bei Änderung der Proliferationskinetik während längerer Versuchsreihen wurden die Zellen verworfen. Nach erneuter

Anzucht von Zellen aus dem tiefgefrorenen Stammpool wurden die Experimente fortgesetzt.

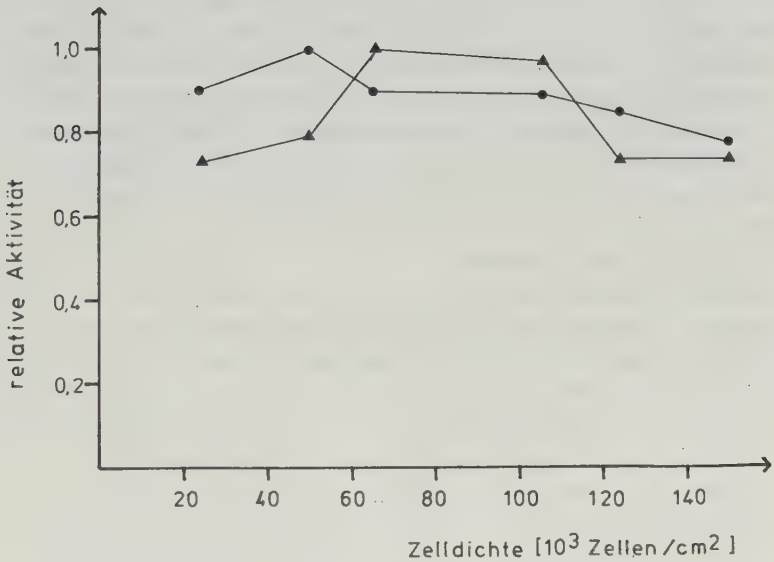
Da anzunehmen ist, daß Regulationsvorgänge zur Induktion von Enzymen innerhalb einer Generationsdauer angelaufen sein müssen und weitere Veränderungen nach darüber hinausgehenden Induktionszeiten nur quantitativer Natur sein können, wurde als Induktionszeit in den folgenden Untersuchungen in der Regel 18 Stunden gewählt.

Die Testsubstanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Aceton gelöst dem Medium zugesetzt. Die Konzentration von 0,5 % Aceton im Medium wurde dabei in keinem Fall überschritten. Als Kriterien für toxische Substanzwirkungen wurde die mikroskopische Kontrolle auf Vakuolisierung und Ablösen der Zellen vom Plattenboden und eine Wachstumsverminderung von mehr als 20 % während der Inkubationszeit herangezogen.



Figur 26: Abhängigkeit der MO- und EH-Aktivität in Reuber-Hepatomazellen von der Zelldichte. Die Zellen wurden 48 Stunden vor der Ernte subkultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Jeder Punkt repräsentiert die Messung einer 150 mm-Kulturschale in Vier- bis Sechsfachbestimmungen.

▲ — ▲ EH-Aktivität
● — ● MO-Aktivität



Figur 27: Abhängigkeit der GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen von der Zelldichte. Die Zellen wurden 48 Stunden vor der Ernte subkultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Jeder Punkt repräsentiert die Messung einer 150 mm-Kulturschale in Vierfachbestimmungen.

▲ — ▲ Substrat DCNB
● — ● Substrat DNCB

4.6.2. Testung einer Reihe ausgesuchter Substanzen auf die Induktion der MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen

Es wurden häufig im Tierexperiment eingesetzt Induktoren wie Phenobarbital, 3-Methylcholanthren, Pregnenolon-16 α -carbonitril und Aroclor 1254 (54), Transstilbenoxid als Substanz mit besonderen präferentiellen Induktionseigenschaften für die EH (55), das Karzinogen 2-Aminofluoren, das Flavonderivat Quercetin und der Östrogenantagonist Cyproteronacetat auf Induktionswirkung der MO-, EH- und GSHT-Aktivität getestet.

Die Bestimmungen der MO und EH erfolgten nach den beschriebenen Methoden (3.6.4.1., 3.6.4.4.). Als Substrat der GSHT dienten jeweils 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (3.6.4.3.). Die MO-Aktivität ist als relative Aktivität zur Kontrolle (relative Aktivität 1 = Kontrolle) dargestellt, während die EH- und GSHT-Aktivität als Prozent von der Kontrolle angegeben sind.

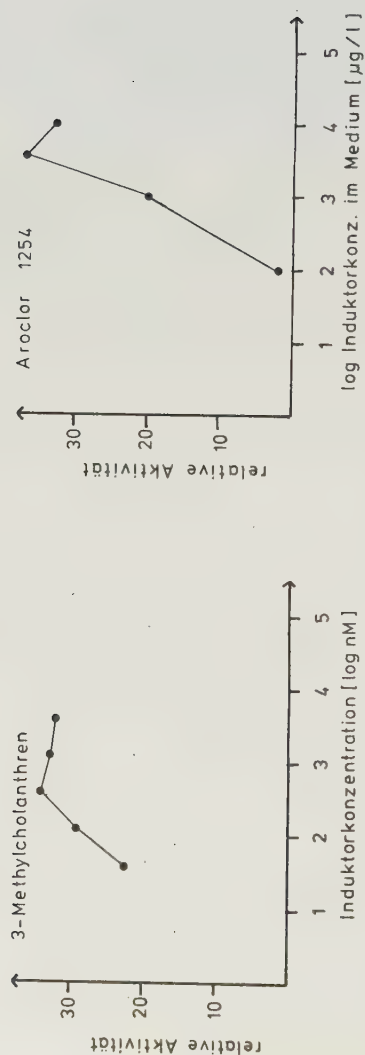
Die Enzymaktivitäten der Zellen einer Platte wurden als Mittelwerte aus Doppel- bis Vielfachbestimmungen ermittelt. In den folgenden Tabellen sind entweder Meßwerte einzelner Platten oder Mittelwerte und Standardabweichungen aus mehreren Platten angegeben, wobei in Klammern die Anzahl der Platten bezeichnet ist.

Die Substanzen 3-Methylcholanthren und Aroclor 1254, Monooxygenaseinduktoren vom P-448-Typ, induzieren schon bei niedrigen Konzentrationen im Medium die MO-Aktivität von Reuber-Hepatomzellen um das 30-fache über das Kontrollniveau (Figur 28). Phenobarbital, tierexperimenteller Induktor vom P-450-Typ (15), steigert die MO-Aktivität erst bei der hohen Konzentration von 2 mM auf das 4-fache. Dasselbe Induktionsniveau wird nach Behandlung mit 1,5 bis 100 μ M 2-Aminofluoren erreicht (Figur 29). Dieses Plateau, in einem breiten Bereich vor der Toxizitätsgrenze, läßt einen besonderen Induktionsmechanismus oder die Bildung einer bestimmten Monooxygenaseform vermuten. Die Steroide

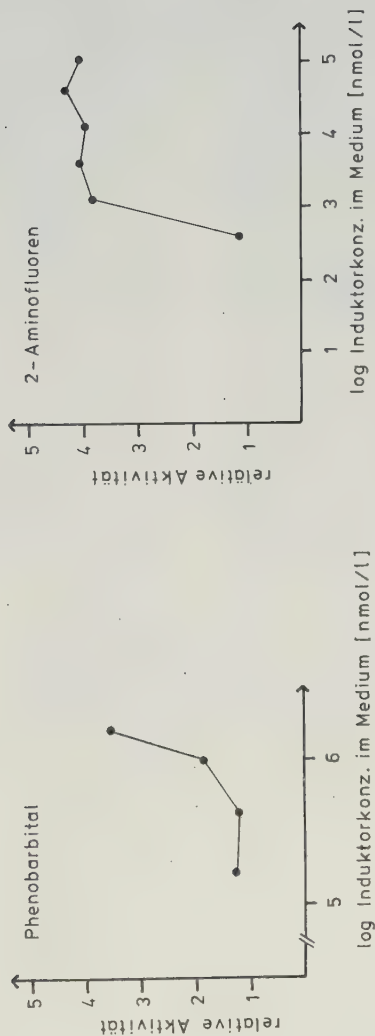
Pregnenolon-16 α -carbonitril (Faktor 1,5) und Cyproteron-acetat (Faktor 3) erhöhen die MO-Aktivität signifikant, während weder Transstilbenoxid noch Quercetin als MO-Induktoren in Reuber-Hepatomzellkulturen wirksam werden (Tabelle 13).

Eine zunächst für möglich gehaltene Induktion der EH-Aktivität mit 100 μ M TSO konnte durch einen Versuch mit hoher Plattenzahl nicht bestätigt werden. Ein positiver Effekt auf die EH-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen wurde für keine der untersuchten Substanzen (Tabelle 14) gezeigt.

Aus den Tabellen 15 und 16 ist zu entnehmen, daß für keine der getesteten Substanzen ein signifikanter Induktionseffekt der GSHT-Aktivität im 10 000 g-Überstand der Reuber-Hepatomzellen gemessen mit den Substraten 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol nachgewiesen werden konnte.



Figur 28: Induktion der MO-Aktivität in Renner-Hepatomzellen durch 3-Methylcholanthren und Aroclor 1254. Es wurden jeweils 2 - 3 150 mm-Platten mit der Substanz für 18 Stunden behandelt. Die Aktivitätsangabe wurde auf die Kontrollen bezogen (Kontrolle = relative Aktivität 1).



Figur 29: Induktion der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen durch Phenobarbital und 2-Aminofluorene. Es wurden jeweils 2 - 3 150 mm-Platten mit der Substanz für 18 Stunden behandelt. Die Aktivitätsangabe wurde auf die Kontrollen bezogen (Kontrolle = relative Aktivität 1).

Tabelle 13: Induktion der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen

Induktorkonzentration im Medium	Kontrollaktivität [pmol 7-Hydroxy- cumarin/mg Pr./min]	Aktivität nach Induktion [% von Kontrolle]
5 μ M TSO	$9,7 \pm 0,9$ (4)	80 ± 10 (2)
50 μ M TSO	$10,2 \pm 0,5$ (3)	$103 \pm 8,8$ (2)
100 μ M TSO	$10,2 \pm 0,5$ (3)	17 ± 3 (2)
10 μ M PCN	$9,7 \pm 0,9$ (4)	122 , 131
50 μ M PCN	$9,7 \pm 0,9$ (4)	152 , 184
50 μ M PCN	$10,2 \pm 0,5$ (3)	103 , 148
100 μ M PCN	$10,2 \pm 0,5$ (3)	137
3 μ M Cyproteron- acetat	$11,6 \pm 0,9$ (3)	110
10 μ M Cyproteron- acetat	$11,6 \pm 0,9$ (3)	190
30 μ M Cyproteron-	$11,6 \pm 0,9$ (3)	259 , 336
1,5 μ M Quercetin	$11,6 \pm 0,9$ (3)	112
5 μ M Quercetin	$11,6 \pm 0,9$ (3)	121
15 μ M Quercetin	$11,6 \pm 0,9$ (3)	90

Die Aktivität einer Platte wurde durch Doppel- und Dreifachbestimmungen ermittelt. Die angegebenen Werte repräsentieren entweder Mittel und Standardabweichungen mehrerer Platten, wobei in Klammern die Anzahl der Platten beziffert ist, oder die Aktivität von einzelnen Platten.

Tabelle 14: Induktion der EH-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen

Induktorkonzentration im Medium	Kontrollaktivität [pmol BP-4,5-diol/ mg Pr./min]	Aktivität nach Induktion [% von Kontrolle]
1 mM PB	272 ± 15 (3)	90 , 96
2 mM PB	272 ± 15 (3)	93 , 102
4 µM MC	230 ± 13,4 (4)	102 , 110
50 µM PCN	230 ± 13,4 (4)	114 , 107
50 µM PCN	272 ± 15 (3)	85 , 115
100 µM PCN	272 ± 15 (3)	88 , 99
3,3 µg/ml Aroclor 1254	272 ± 15 (3)	96
10 µg/ml Aroclor 1254	272 ± 15 (3)	82, 100
50 µM TSO	272 ± 15 (3)	95 , 101
100 µM TSO	272 ± 15 (3)	123 , 141
100 µM TSO	290 ± 32,6 (6)	102 , 9,8 (5)
3 µM 2-Aminofluoren	257 ± 36 (3)	102
10 µM 2-Aminofluoren	257 ± 36 (3)	95
30 µM 2-Aminofluoren	257 ± 36 (3)	106
100 µM 2-Aminofluoren	257 ± 36 (3)	109
1,5 µM Quercetin	257 ± 36 (3)	98
5 µM Quercetin	257 ± 36 (3)	87
15 µM Quercetin	257 ± 36 (3)	86
3 µM Cyproteron- acetat	257 ± 36 (3)	95
10 µM Cyproteron- acetat	257 ± 36 (3)	98
30 µM Cyproteron- acetat	257 ± 36 (3)	111

Tabelle 15: Induktion der GSHT-Aktivität im 10 000 g-Überstand von Reuber-Hepatomzellen, bestimmt mit dem Substrat DNCB

Induktorkonzentration im Medium	Kontrollaktivität [nmol GSH-Konjugat/mg Pr./min]	Aktivität nach Induktion [% von Kontrolle]
1 mM PB	365 ± 42,7 (3)	91 , 111
2 mM PB	365 ± 42,7 (3)	95 , 96
4 µM MC	344 ± 17,9 (2)	80 , 102
50 µM PCN	365 ± 42,7 (3)	78 , 105
100 µM PCN	365 ± 42,7 (3)	82 , 101
3,3 µg/ml Aroclor	373 ± 29,8 (2)	100
3,3 µg/ml Aroclor	365 ± 42,7 (3)	98 , 101
3,3 µg/ml Aroclor	295 ± 10 (2)	133
10 µg/ml Aroclor	373 ± 29,8 (2)	113
10 µg/ml Aroclor	365 ± 42,7 (3)	98 , 102
10 µg/ml Aroclor	295 ± 10 (2)	111
50 µM TSO	365 ± 42,7 (3)	103 , 110
100 µM TSO	365 ± 42 7 (3)	117 , 118
50 µM 2-Aminofluoren	295 ± 10 (2)	97
50 µM 2-Aminofluoren	373 ± 29,8 (2)	104
100 µM 2-Aminofluoren	295 ± 10 (2)	120
100 µM 2-Aminofluoren	373 ± 29,8 (2)	91
15 µM Quercetin	295 ± 10 (2)	106
15 µM Quercetin	373 ± 29,8 (2)	99
50 µM Quercetin	295 ± 10 (2)	107
50 µM Quercetin	373 ± 29,8 (2)	106
3 µM Cyproteron- acetat	381 ± 20 (2)	104
10 µM Cyproteron- acetat	381 ± 20 (2)	110
30 µM Cyproteron- acetat	381 ± 20 (2)	125

Tabelle 16: Induktion der GSHT-Aktivität im 10 000 g-Überstand von Reuber-Hepatoma-Zellen, bestimmt mit dem Substrat DCNB

Induktorkonzentration im Medium	Kontrollaktivität [nmol GSH-Konjugat/mg Pr./min]	Aktivität nach Induktion [% von Kontrolle]
1 mM PB	14,3 $\pm$ 1,5 (3)	97 , 122
2 mM PB	14,3 $\pm$ 1,5 (3)	93 , 108
4 μ M MC	10,7 $\pm$ 0,3 (2)	96 , 108
50 μ M PCN	14,3 $\pm$ 1,5 (3)	85 , 110
100 μ M PCN	14,3 $\pm$ 1,5 (3)	72 , 88
3,3 μ g/ml Aroclor	11,0 $\pm$ 0,3 (2)	132
3,3 μ g/ml Aroclor	13,4 $\pm$ 0,6 (2)	99
3,3 μ g/ml Aroclor	14,3 $\pm$ 1,5 (3)	85 , 91
10 μ g/ml Aroclor	11,0 $\pm$ 0,3 (2)	118
10 μ g/ml Aroclor	13,4 $\pm$ 0,6 (2)	113
10 μ g/ml Aroclor	14,3 $\pm$ 1,5 (3)	86 , 107
50 μ M TSO	14,3 $\pm$ 1,5 (3)	93 , 105
100 μ M TSO	14,3 $\pm$ 1,5 (3)	93 , 115
50 μ M 2-Aminofluoren	11,0 $\pm$ 0,3 (2)	90
50 μ M 2-Aminofluoren	13,4 $\pm$ 0,6 (2)	96
100 μ M 2-Aminofluoren	11,0 $\pm$ 0,3 (2)	103
100 μ M 2-Aminofluoren	13,4 $\pm$ 0,6 (2)	96
15 μ M Quercetin	11,0 $\pm$ 0,3 (2)	103
15 μ M Quercetin	13,4 $\pm$ 0,6 (2)	100
50 μ M Quercetin	11,0 $\pm$ 0,3 (2)	104
50 μ M Quercetin	13,4 $\pm$ 0,6 (2)	92
3 μ M Cyproteron- acetat	6,9 $\pm$ 1,0 (3)	97
10 μ M Cyproteron- acetat	6,9 $\pm$ 1,0 (3)	104
30 μ M Cyproteron- acetat	6,9 $\pm$ 1,0 (3)	100

4.6.3. Beeinflussung der MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatoma-Zellen durch α - und β -Naphthoflavon

Die stereoisomeren Benzoflavone α - und β -Naphthoflavon haben in Bezug auf die P-448 assoziierte Form der Monooxygenase sowohl induzierende als auch inhibierende Eigenschaften, wobei das α -Naphthoflavon (ANF) stärkere Inhibitions- und das β -Naphthoflavon (BNF) ausgeprägtere Induktionswirkungen zeigt (56, 57). Bei gezielter Änderung aktivierender und inaktivierender Enzyme durch Zugabe von stereoisomeren Effektoren zum Zellkulturmedium können wertvolle Hinweise zur Rolle eines bestimmten Metaboliten für die Mutagenese oder Karzinogenese im eukaryotischen System erarbeitet werden. Welche Voraussetzungen Reuber-Hepatoma-Zellen für eine solche Vergleichsstudie bieten, soll durch Bestimmung der MO-, EH- und GSHT-Aktivität nach Behandlung mit α - und β -Naphthoflavon untersucht werden.

Beide Flavone induzieren die MO-Aktivität auf das 30-fache der Kontrollen. Dieses Niveau wird bereits bei einer 0,5 μ M BNF-Konzentration erreicht, während zur Erzielung des gleichen Induktionseffektes eine 15 μ M ANF-Zugabe zum Medium erforderlich ist. Bei einer Konzentration von 50 μ M ist ANF in Bezug auf die MO-Aktivität bereits toxisch (Figur 30). Bei einer Konzentration von 20 μ M bei der MO-Messung hemmen beide Substanzen die Desalkylierung von 7-Äthoxycumarin durch nicht induzierte Reuber-Hepatoma-Zellen zwischen 95 bis 100 %. In Zellen, die durch einen polyzyklischen Kohlenwasserstoff induziert waren, wirkte ANF etwas stärker inhibierend als BNF (Tabelle 17). Die Induktion der MO-Aktivität in Reuber-Hepatoma-Zellen mit 15 μ M BNF beginnt nach ca. vier Stunden (Figur 31). Davor liegt die Aktivität unter der Kontrollaktivität, vermutlich weil trotz der Spülvorgänge genügend BNF in den Inkubationsansatz gelangt, um inhibitorisch wirksam zu werden.

Ein Zusatz von 50 μ M ANF zum Medium erhöht die EH-Aktivität

um etwa 45 % und 50 μM BNF um etwa 65 % (Figuren 32 - 34). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Aktivitätsvermehrung nicht von der Behandlungszeit auf der Platte (in vivo) abhängig ist (Figur 33). Darum wurde geprüft, ob beide Substanzen die EH im Inkubationsansatz (in vitro) beeinflussen. Sowohl durch ANF als auch durch BNF wurden Aktivierungseffekte auf mehr als das Zweifache der Ausgangsaktivität bei einer Konzentration von 50 μM im Inkubationsansatz festgestellt (Figur 34). Auch geringe Konzentrationen von 1 und 5 μM bewirken deutliche Aktivierungseffekte (Figur 35).

Für keinen der beiden Stereoisomere konnte eine signifikante Induktion der GSHT-Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 18).

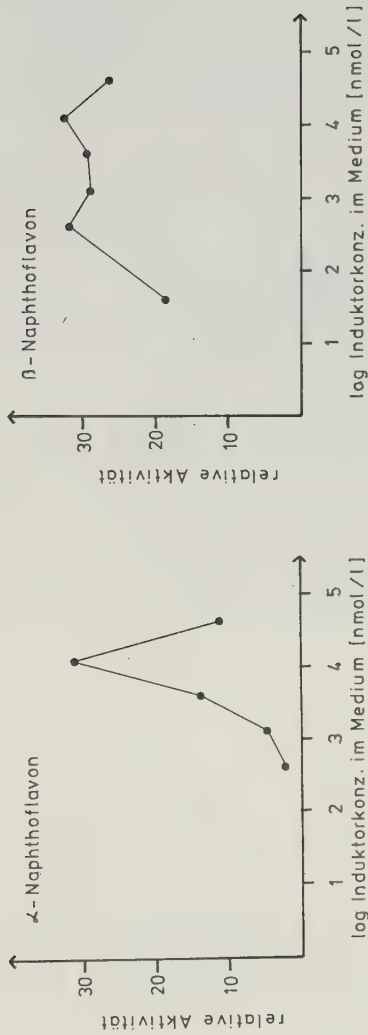
Tabelle 17: Hemmung der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen durch ANF und BNF nach Induktion mit Picen

Inhibitor in vitro	Kontrollaktivität [pmol 7-Hydroxycumarin/mg Pr./min]	Induzierte Aktivität [pmol 7-Hydroxycumarin/mg Pr./min]	Inhibition [% der induzierten Aktivität]
ANF 20 μM	11,2 $\pm$ 0,5 (3)	335 $\pm$ 10 (2)	1,2 $\pm$ 0,1 (2)
BNF 20 μM	11,2 $\pm$ 0,5 (3)	335 $\pm$ 10 (2)	12,2 $\pm$ 0,4 (2)

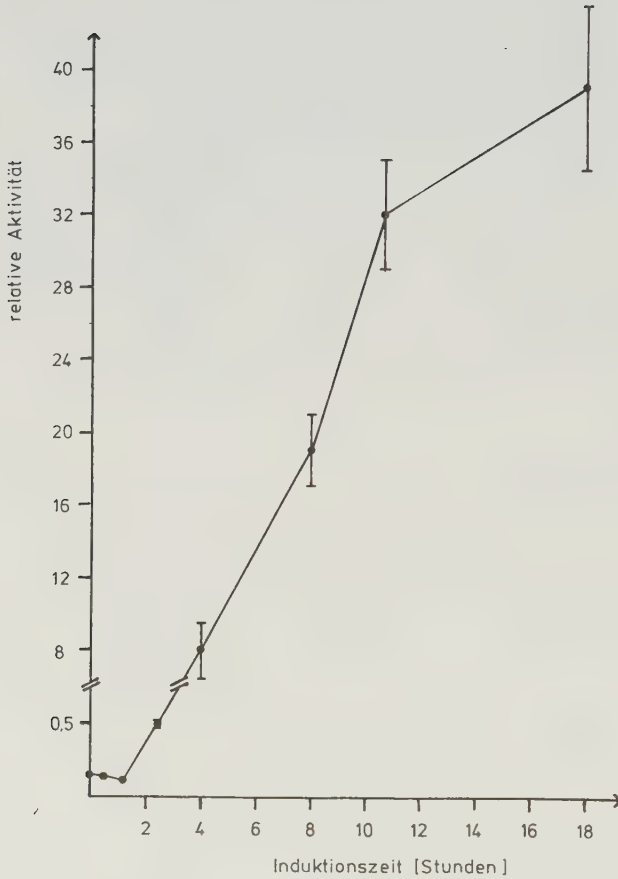
Die Induktionszeit auf der Platte mit einer Picen-Konzentration von 0,1 μM betrug 18 Stunden. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der in Doppel- bis Dreifachbestimmungen gemessenen Platten. In Klammern ist die Anzahl der Platten beziffert.

Tabelle 18: Wirkung von ANF und BNF auf die GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen

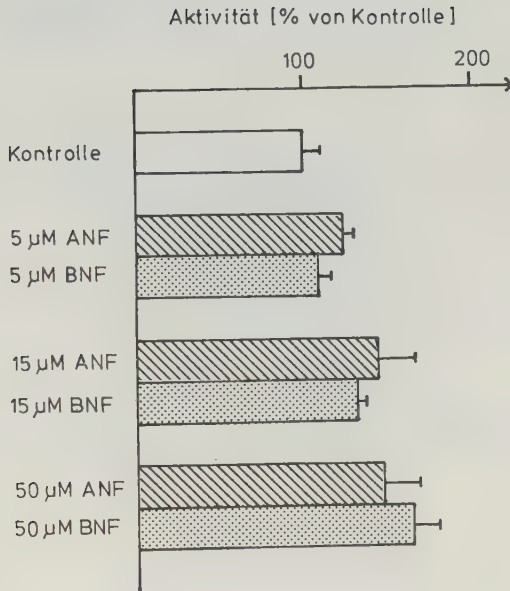
Substrat DNCB		
Substanz	Kontrollaktivität [nmol GSH-Konjugat/mg Pr./min]	Aktivität [% von Kontrolle]
50 μ M ANF	301 $\pm$ 25 (2)	102 , 110
50 μ M BNF	301 $\pm$ 25 (2)	105 , 116
50 μ M BNF	433 $\pm$ 45 (3)	103
Substrat DCNB		
50 μ M ANF	11,3 $\pm$ 0,8 (4)	82 , 88
50 μ M BNF	11,3 $\pm$ 0,8 (4)	72 , 82



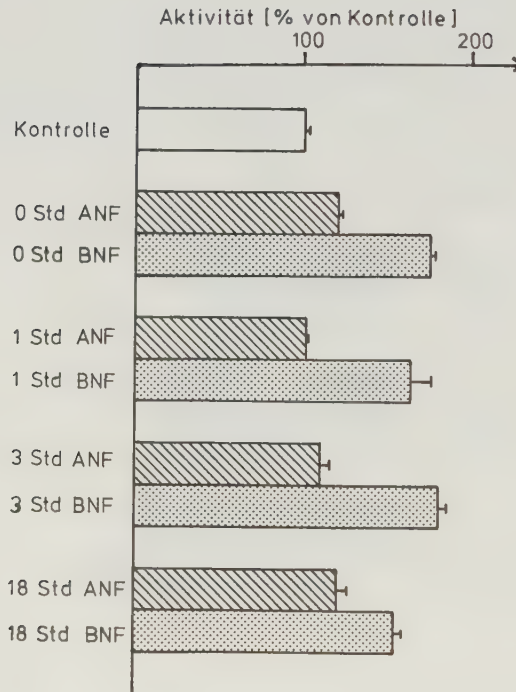
Figur 30: Induktion der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen durch ANF und BNF.
 Es wurden jeweils 2 - 3 150 mm-Platten mit der Substanz für 18 Stunden
 behandelt. Die Aktivitätsangabe wurde auf die Kontrollen bezogen
 (Kontrolle = relative Aktivität 1).



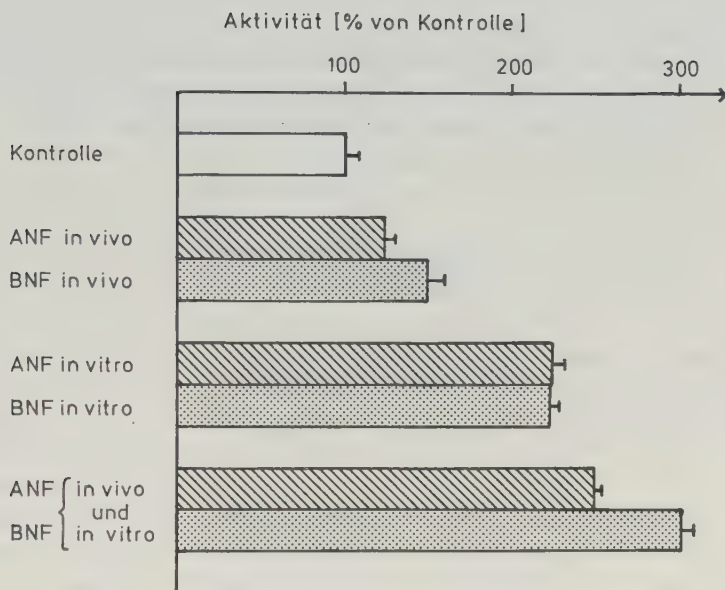
Figur 31: Induktion der MO-Aktivität in Reuber-Hepatoma-
zellen durch BNF in Abhängigkeit von
der Induktionszeit. Angegeben sind Mittel
und Standardabweichungen von jeweils 2 Platten.



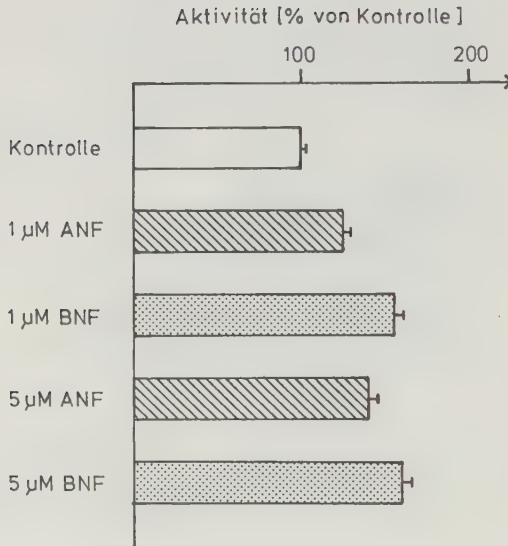
Figur 32: Wirkung verschiedener ANF- und BNF-Konzentrationen auf die EH-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen bei einer Behandlungszeit von 18 Stunden. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 150 mm-Platten.



Figur 33: Wirkung von 50 μ M ANF und 50 μ M BNF auf die EH-Aktivität in Reuber-Hepatomazellen bei verschiedenen Behandlungszeiten. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 150 mm-Platten. Beim 0-Stunden-Wert wurden die Substanzen im Medium 2 Minuten lang auf der Platte geschwenkt.



Figur 34: Wirkung von ANF und BNF auf die EH-Aktivität in Reuber-Hepatomazellen bei Zugabe im Medium (in vivo) und im Inkubationsansatz (in vitro). Sowohl die 18-stündige Behandlung im Medium als auch die Beifügung in der Inkubationsmischung erfolgte mit einer Konzentration beider Substanzen von 50 μ M. Die Substanzen wurden in 10 μ l DMSO bei entsprechender Behandlung der Kontrollen dem Inkubationsansatz zugesetzt. Die Säulen repräsentieren Mittel und Standardabweichungen von zwei 150 mm-Platten.



Figur 35: Wirkung niedriger ANF- und BNF-Konzentrationen bei Zugabe in vitro auf die EH-Aktivität in Reuber-Hepatomazellen. Die in vitro-Zugabe erfolgte in 10 µl DMSO bei entsprechender Behandlung der Kontrollen. Die Säulen repräsentieren jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 150 mm-Platten.

4.6.4. Wirkungsvergleich von karzinogenen mit nicht oder schwach karzinogen wirksamen Strukturisomeren auf die MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen

Ein erfolgsversprechender Ansatz, ein rationales Verständnis und gezielte Beeinflussungsmöglichkeiten des Angriffs ultimaler Karzinogene in den Zellstoffwechsel zu gewinnen, ist die Untersuchung des Metabolismus von Substanzpaaren, die sich chemisch und physikalisch nur gering unterscheiden, aber eine stark voneinander abweichende karzinogene und mutagene Potenz aufweisen. Unter diesem Aspekt wurden die Wirkungen der folgenden Stereoisomere auf die MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen untersucht: Benzo(a)pyren - Benzo(e)pyren, Dibenz(a,h)anthracen - Picen (58, 59), 7-Methylbenzo(c)acridin - 12-Methylbenzo(a)-acridin, die an Position 2, 3 und 4 fluorierten 7-Methyl-6H-[1]benzothiopyrano[4,3-b]chinoline (60, 61) (siehe Figur 36).

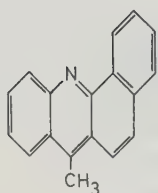
Auf die MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen wirkte Benzo(a)pyren bereits bei einer Konzentration von 50 nM im Medium stark induzierend, bei 0,5 µM wurde das Maximum erreicht und darüber hinaus zeigte sich eine zunehmende Toxizität. Im Gegensatz zu den Befunden von Arcos et al. (62) war für Benzo(e)pyren in mehreren Experimenten ab einer Konzentration von 15 µM eine deutliche Induktion der MO-Aktivität feststellbar. Die höchste Substanzzugabe von 150 µM hatte den gleichen Induktionseffekt wie der optimale Einsatz von Benzo(a)pyren. Das verwendete Benzo(e)pyren wurde als hochreine Referenzsubstanz für Karzinogenitätsstudien von Dr. J. Jacob (Biochemisches Institut für Umweltkarzinogene, Ahrensburg) zur Verfügung gestellt. Dies läßt vermuten, daß Benzo(e)pyren bei genügend hoher Konzentration wie die meisten polyzyklischen Kohlenwasserstoffe ein Induktor ist. Allerdings ist zu bedenken, daß verschiedene polyzyklische Kohlenwasserstoffe bereits bei mehr als 1 000-fach geringerer Konzentration eine ähnliche

Wirkung wie Benzo(e)pyren zeigten (Figur 38). Überdies steigt die induzierende Wirkung von Benzo(e)pyren in einem Bereich mit der Dosis an, in dem die Substanz schon massiv ausfällt. Diese Tatsache deutet eher auf eine Verunreinigung als induzierendes Agens hin. Jedenfalls unterscheidet sich Benzo(e)pyren von anderen polyzyklischen Kohlenwasserstoffen dadurch, daß es die MO nicht oder erst bei praktisch irrelevanten Dosierungen induziert.

Sowohl Dibenz(a,h)anthracen als auch Picen zeichneten sich durch eine hohe Induktionspotenz der MO-Aktivität schon bei der sehr niedrigen Konzentration von 10 nM aus (Figur 38). Augenfällig ist die ausgeprägte Toxizität von Dibenz(a,h)anthracen ab 5 µM im Medium für 18 Stunden. 7-Methylbenzo(c)-acridin und 12-Methylbenzo(a)acridin induzierten die MO-Aktivität um den Faktor 30, wobei für das nicht karzinogene 12-Methylbenzo(a)acridin aufgrund geringerer Toxizität ein relativ breites Plateau in Abhängigkeit von der Konzentration zu beobachten war (Figur 39). Die Induktionspotenz des 2-Fluor-7-methyl-6H- [1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolins war mit einem maximalen Induktionsfaktor von 10 gegenüber den an den Positionen 3 und 4 fluorierten Isomeren (Induktionsfaktor 16) in wiederholten Versuchen deutlich schwächer (Figur 40). Dies ist allerdings kaum auf eine schwächere induzierende Wirkung zurückzuführen, sondern auf höhere Toxizität, denn bei niedrigeren Dosierungen zeigten alle drei Isomere sehr ähnliche Induktionswirkungen.

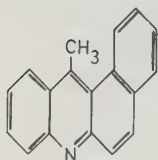
Der deutlich positive Effekt von 12-Methylbenzo(a)acridin auf die EH-Aktivität konnte auf eine Aktivierung zurückgeführt werden. In Analogie zur Figur 33 wurde bei einer Behandlungszeit von wenigen Minuten im Medium bereits die Aktivität um etwa 40 % über die Kontrollen erhöht, und die Zugabe der Substanz zum Inkubationsansatz zeigte eine Umsatzerhöhung (Figur 41). Für die anderen untersuchten Verbindungen war keine Aktivitätsvermehrung der EH-Aktivität in Reuber-Hepatomazellen nachweisbar (Tabelle 19).

Picen wirkte bei einer Konzentration von 50 μ M in mehreren unabhängigen Versuchen geringgradig positiv auf die GSHT-Aktivität, gemessen mit dem Substrat DNCB. Die statistische Signifikanz müßte allerdings noch mit einer hohen Plattenzahl geprüft werden. Ansonsten war weder für die geprüften polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe noch für die heteropolyzyklischen aromatischen Verbindungen eine Aktivitätserhöhung der GSHT mit den Substraten DNCB und DCNB in Reuber-Hepatomzellen feststellbar (Tabellen 20 und 21).



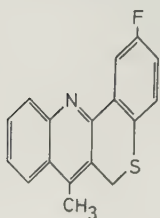
7-Methylbenzo(c)acridin

karzinogen



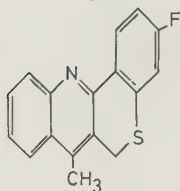
12-Methylbenzo(a)acridin

nicht karzinogen



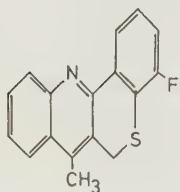
2-Fluor-7-methyl-6H-[1]benzo-
thiopyrano-[4,3-b]chinolin

nicht karzinogen



3-Fluor-7-methyl-6H-[1]benzo-
thiopyrano-[4,3-b]chinolin

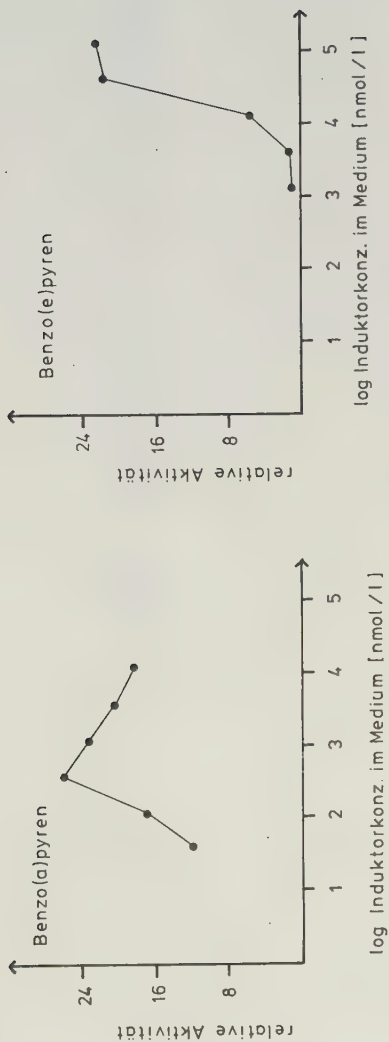
nicht karzinogen



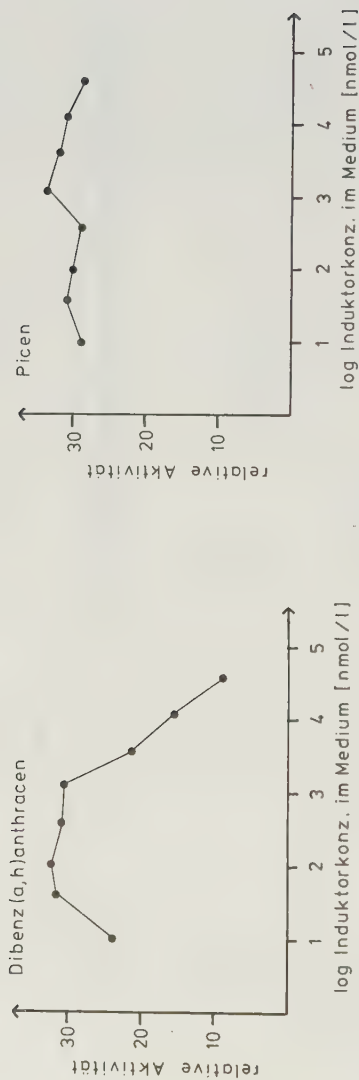
4-Fluor-7-methyl-6H-[1]benzo-
thiopyrano-[4,3-b]chinolin

karzinogen

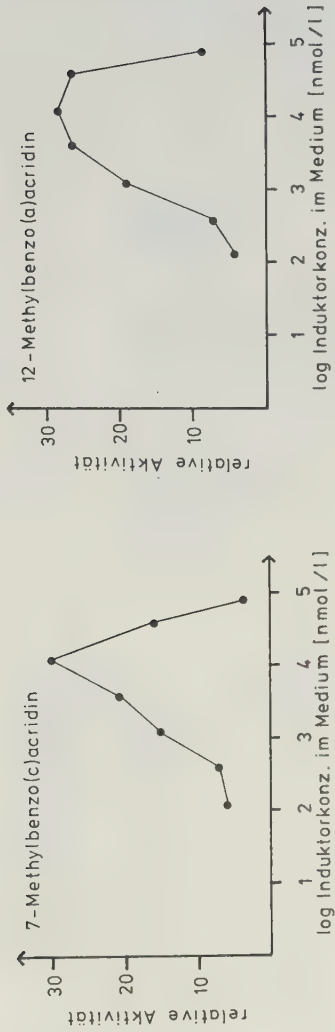
Figur 36: Formeln der karzinogenen und nicht karzinogenen heteropolzyklischen aromatischen Strukturisomeren.



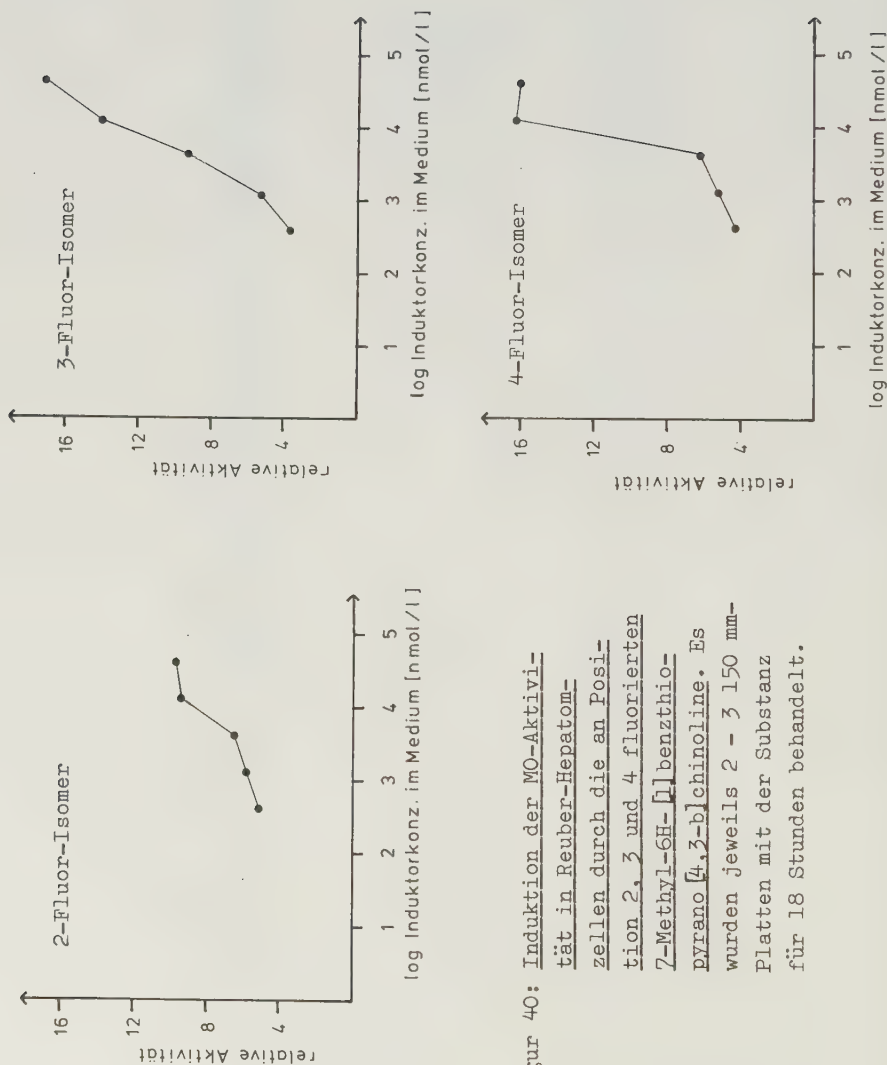
Figur 37: Induktion der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen durch Benzo(a)pyren und Benzo(e)pyren. Es wurden jeweils 2 - 3 150 mm-Platten mit der Substanz für 18 Stunden behandelt.



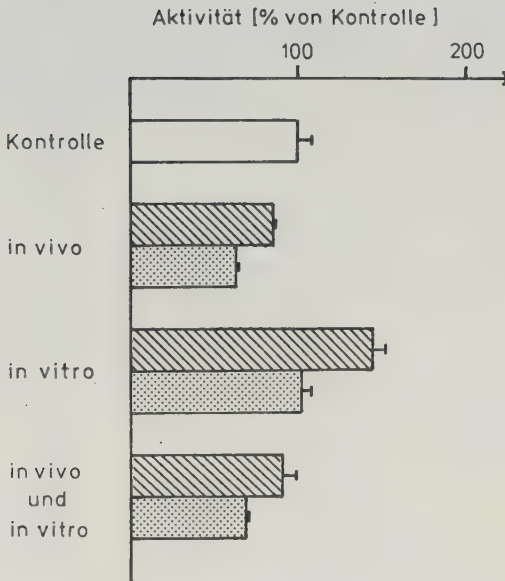
Figur 38: Induktion der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen durch Dibenzo(a,h)anthracen und Picein. Es wurden jeweils 2 - 3 150 mm-Platten mit der Substanz für 18 Stunden behandelt.



Figur 39: Induktion der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen durch 7-Methylbenzo(c)acridin und 12-Methylbenzo(a)acridin. Es wurden jeweils 2 - 3 150 mm-Platten mit der Substanz für 18 Stunden behandelt.



Figur 40: Induktion der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen durch die an Position 2, 3 und 4 fluorierten 2-Methyl-6H-[4,3-b]chinoline. Es wurden jeweils 2 - 3 150 mm-Platten mit der Substanz für 18 Stunden behandelt.



Figur 41: Wirkung von 7-Methylbenzo(c)acridin und 12-Methylbenzo(a)acridin in vivo und in vitro auf die EH-Aktivität in Reuber-Hepatomezellen. Die Substanzen wurden sowohl für 18 Stunden im Kulturmedium (in vivo) als auch in der Inkubationsmischung (in vitro) in einer Konzentration von 50 μ M eingesetzt. Die Säulen repräsentieren Mittel und Standardabweichungen aus 2 150 mm-Platten.

7-Methylbenzo(c)acridin 
12-Methylbenzo(a)acridin 

Tabelle 19: Wirkung karzinogener und nicht karzinogener Substanzen auf die EH-Aktivität in Reuber-Hepatomezellen

Substanz	Kontrollaktivität [pmol BP-4,5-diol/ mg Pr./min]	Aktivität [% von Kontrolle]
Benzo(a)pyren		
1,5 µM	248 ± 10 (2)	114 , 116
5 µM	248 ± 10 (2)	110 , 112
15 µM	248 ± 10 (2)	103 , 109
Benzo(e)pyren		
1,5 µM	248 ± 10 (2)	99 , 107
5 µM	248 ± 10 (2)	106 , 112
15 µM	248 ± 10 (2)	97 , 99
50 µM	248 ± 10 (2)	89 , 111
Dibenz(a,h)anthracen		
1,5 µM	249 ± 46 (3)	104 , 120
5 µM	249 ± 46 (3)	96 , 104
15 µM	249 ± 46 (3)	78 , 97
50 µM	249 ± 46 (3)	89 , 111
Picen		
1,5 µM	249 ± 46 (3)	110 , 113
5 µM	249 ± 46 (3)	102 , 102
15 µM	249 ± 46 (3)	96 , 100
50 µM	249 ± 46 (3)	93 , 103
7-Methylbenzo(c)acridin		
2,5 µM	277 ± 5,7 (2)	96 , 103
25 µM	277 ± 5,7 (2)	121 , 128
50 µM	215 ± 15 (2)	61 , 65
12-Methylbenzo(a)acridin		
2,5 µM	277 ± 5,7 (2)	107 , 127
25 µM	277 ± 5,7 (2)	130 , 144
50 µM	215 ± 15 (2)	84 , 86

2-Fluor-7-methyl-6H-[1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolin 1,5 µM 5 µM 15 µM	244 ± 22 (3) 244 ± 22 (3) 244 ± 22 (3)	107 , 113 94 113 , 129
3-Fluor-7-methyl-6H-[1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolin 1,5 µM 5 µM 15 µM 50 µM	244 ± 22 (3) 244 ± 22 (3) 244 ± 22 (3) 244 ± 22 (3)	107 113 , 120 112 , 121 122 , 115
4-Fluor-7-methyl-6H-[1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolin 1,5 µM 5 µM 15 µM	244 ± 22 (3) 244 ± 22 (3) 244 ± 22 (3)	112 101 , 116 111 , 117

Tabelle 20: Wirkung karzinogener und nicht karzinogener Substanzen auf die GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen gemessen mit dem Substrat DNCB

Substanz	Kontrollaktivität [nmol GSH-Konjugat/mg Pr./min]	Aktivität [% von Kontrolle]
Benzo(a)pyren 5 µM 5 µM 15 µM 15 µM	$373 \pm 29,8$ (2) $295 \pm 29,1$ (2) $373 \pm 29,1$ (2) 295 ± 10 (2)	78 93 80 102
Benzo(e)pyren 15 µM 15 µM 50 µM 50 µM	295 ± 10 (2) $373 \pm 29,8$ (2) 295 ± 10 (2) $373 \pm 29,8$ (2)	99 90 94 78

Dibenz(a,h)anthracen		
1,5 µM	295 ± 10 (2)	113
1,5 µM	373 ± 29,8 (2)	101
5 µM	433 ± 45 (2)	93 , 112
15 µM	295 ± 10 (2)	114
15 µM	373 ± 29,8 (2)	93
Picen		
5 µM	433 ± 45 (3)	106 , 118
15 µM	433 ± 45 (3)	105 , 105
50 µM	433 ± 45 (3)	124 , 132
50 µM	295 ± 10 (2)	136
50 µM	373 ± 29,8 (2)	111
2-Fluor-7-methyl-6H- [1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolin		
5 µM	301 ± 25 (2)	117
15 µM	301 ± 25 (2)	92
50 µM	295 ± 10 (2)	107
50 µM	373 ± 29,8 (2)	109
3-Fluor-7-methyl-6H- [1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolin		
5 µM	301 ± 25 (2)	79 , 109 , 108
15 µM	301 ± 25 (2)	93
50 µM	301 ± 25 (2)	90 , 97
50 µM	295 ± 10 (2)	122
50 µM	373 ± 29,8 (2)	108
4-Fluor-7-methyl-6H- [1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolin		
5 µM	301 ± 25 (2)	99 , 100
15 µM	301 ± 25 (2)	113 , 112
50 µM	301 ± 25 (2)	110
50 µM	295 ± 10 (2)	118
50 µM	373 ± 29,8 (2)	102

Tabelle 21: Wirkung karzinogener und nicht karzinogener Substanzen auf die GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomazellen gemessen mit dem Substrat DCNB

Substanz	Kontrollaktivität [GSH-Konjugat/mg Pr./min]	Aktivität [% von Kontrolle]
Benzo(a)pyren		
5 µM	11,0 ± 0,3 (2)	91
5 µM	13,4 ± 0,6 (2)	81
15 µM	11,0 ± 0,3 (2)	108
15 µM	13,4 ± 0,6 (2)	80
Benzo(e)pyren		
15 µM	11,0 ± 0,3 (2)	124
15 µM	13,4 ± 0,6 (2)	109
50 µM	11,0 ± 0,3 (2)	119
50 µM	13,4 ± 0,6 (2)	109
Dibenz(a,h)anthracen		
1,5 µM	11,3 ± 0,8 (4)	94 , 103
1,5 µM	11,0 ± 0,3 (2)	90
1,5 µM	13,4 ± 0,6 (2)	87
5 µM	11,3 ± 0,8 (4)	73 , 76
15 µM	11,3 ± 0,8 (4)	90 , 107
15 µM	11,0 ± 0,3 (2)	104
15 µM	13,4 ± 0,6 (2)	78
Picen		
1,5 µM	11,3 ± 0,8 (4)	104 , 117
5 µM	11,3 ± 0,8 (4)	105 , 101
15 µM	11,3 ± 0,8 (4)	102 , 86
50 µM	11,3 ± 0,8 (4)	110 , 80
50 µM	11,0 ± 0,3 (2)	117
50 µM	13,4 ± 0,6 (2)	102

2-Fluor-7-methyl-6H-[1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolin		
5 μM	$8,8 \pm 0,5 (2)$	83 , 75
15 μM	$8,8 \pm 0,5 (2)$	109
50 μM	$8,8 \pm 0,5 (2)$	95
50 μM	$11,0 \pm 0,3 (2)$	103
50 μM	$13,4 \pm 0,6 (2)$	101
3-Fluor-7-methyl-6H-[1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolin		
5 μM	$8,8 \pm 0,5 (2)$	94 , 120
15 μM	$8,8 \pm 0,5 (2)$	88
50 μM	$8,8 \pm 0,5 (2)$	88 , 95
50 μM	$11,0 \pm 0,3 (2)$	99
50 μM	$13,4 \pm 0,6 (2)$	73
4-Fluor-7-methyl-6H-[1] benzothiopyrano- [4,3-b] chinolin		
5 μM	$8,8 \pm 0,5 (2)$	113 , 118
15 μM	$8,8 \pm 0,5 (2)$	101 , 109
50 μM	$8,8 \pm 0,5 (2)$	93 , 128
50 μM	$11,0 \pm 0,3 (2)$	104
50 μM	$13,4 \pm 0,6 (2)$	90

5. DISKUSSION

5.1. Enzymmessungen

Die Erarbeitung exakter Meßmethoden ist eine Grundvoraussetzung, die Beziehung zwischen der Kontrolle reaktiver Metabolite durch aktivierende und inaktivierende Enzyme und der Mutagenese und Karzinogenese im Zellkultursystem zu untersuchen. Zudem ist in diesem Zusammenhang die Verwendung von Substraten erstrebenswert, deren Wirkung als ultimale Mutagene oder Karzinogene bekannt ist. Von den tierexperimentell gut erforschten Stoffwechselwegen der Modells substanz Benzo(a)pyren ausgehend, besitzt das Benzo(a)pyren-4,5-oxid erfolgversprechende Voraussetzungen, um als Substrat zur Messung der Epoxidhydratase (42) und der Glutathion-S-Transferasen (21) eingesetzt zu werden. Die analytische Erfassung der zumeist instabilen reaktiven Metaboliten nach Umsetzung mit dem Monooxygenasesystem ist sehr schwierig, so daß in einem Zellkultursystem bei kleinen Proteinmengen und niedrigen Umsatzraten in erster Linie empfindliche fluorometrisch erfassbare Hydroxylierungs- und Desalkylierungsreaktionen zur Messung der MO-Aktivität geeignet erscheinen (33 , 44).

5.1.1. EH-Aktivitätsmessung in Zellkulturen

In der Arbeit von Schmassmann et al. (42) wurde die Gültigkeit eines Verfahrens zur Messung der EH für Rattenlebermikrosomen nachgewiesen. Die qualitative und quantitative Änderung des Reaktionsansatzes bei Einsatz von Reuber-Hepatomzellhomogenaten durch vermehrte Anwesenheit des intrazellulären Glutathions, der GSH-S-Transferasen, der Glucuronsäure- und Sulfotransferasen und der Dihydrodioldehydrogenase machte eine Überprüfung der Validität des Meßverfahrens notwendig. Die Senkung des Substrateinsatzes und die Substrataufreinigung durch Dünnschicht-

chromatographie unter Lichtausschluß erbrachte infolge einer entsprechenden Blindwertverringerung eine Sensitivitätssteigerung gegenüber dem Routineverfahren um den Faktor 8 (4.1.1.1.). Dies ist im wesentlichen auf die erhebliche Reduzierung störender Hydroxy- und Chinonderivate des Benzo(a)pyrens zurückzuführen, die bei der Äthylacetatextraktion (3.5.4.1.) neben dem Produkt der DMSO/H₂O-Phase entzogen werden. Eine intensive Ultraschallhomogenisierung, deren notwendige Dauer in Abhängigkeit von der Fragilität der verwendeten Zellen variiert, garantiert eine geringe Meßwertstreuung von ca. 5 % in Bezug auf den Meßwert (Figuren 1 - 3). Das Radiochromatogramm der Äthylacetatphase einer gut homogenisierten Probe (Figur 4) zeigt nur eine radioaktive Bande mit dem R_F-Wert des BP-4,5-diols, während Radiochromatogramme nach unzureichender Homogenisation einen unterschiedlich ausgeprägten Gipfel mit einem R_F-Wert von 0,68 - 0,73, dem BP-4,5-oxid entsprechend, aufweisen (4.1.1.3.1.). Hieraus und aus der Beobachtung einer scheinbar höheren mittleren Enzymaktivität nach kurzer Ultraschallbehandlung (Figur 1) läßt sich schließen, daß die Proteinaggregation schlecht homogenisierter Proben die Substratentfernung durch den Petroläther stören und somit das Meßergebnis durch eine nicht kalkulierbare Erhöhung der Radioaktivität durch Substratreste in der Äthylacetatphase verfälscht wird.

Begleitenzyme im Inkubationsansatz wie z.B. die Dihydrodioldehydrogenase lassen einen Folgeumsatz des BP-4,5-diols nicht unmöglich erscheinen. Die Messung der BP-4,5-diol-Ausbeuten nach Einsatz von 28 µmol BP-4,5-diol unter den Inkubations- und Extraktionsbedingungen der Epoxidhydratase-messung (3.5.4.1.) zeigte jedoch keine systematische Verringerung der Ausbeuten bei höherer Proteinzugabe und längerer Inkubationszeit (Tabelle 2). Lediglich der Wert von 68,2 % bei 0,88 mg Protein und 30 min Inkubationszeit fällt gegenüber den übrigen Werten zwischen 72,9 % und 82,3 % etwas ab. Dies korrespondiert mit einer leichten Erhöhung des entsprechenden Wertes von 3,9 % bei der Be-

stimmung der Radioaktivität in der DMSO/H₂O-Phase (Tabelle 3), die zur Erfassung möglicher wasserlöslicher Konjugationsprodukte des BP-4,5-diols gemacht wurde. Nach optimaler Ultraschallbehandlung gleicht die Produktausbeute bei der Epoxidhydratasemessung in Reuber-Hepatomen mit ca. 80 % (4.1.1.3.1.) dem von Schmassmann et al. (42) angegebenen Wert für Rattenlebermikrosomen. Ein Verlust von gebildetem BP-4,5-diol durch eine Folge-reaktion ist unter den gewählten Bedingungen bestenfalls von sehr geringem Ausmaß und daher bedeutungslos.

Die Radioaktivität in der DMSO/H₂O-Phase bei der Epoxidhydratasemessung steigt in Abhängigkeit von Zeit und Protein nicht linear an (Figur 6, Tabelle 4). Sie ist insbesondere bei niedrigen Substratumsatzraten relativ beträchtlich (Tabelle 4). Der Kurvenverlauf der Radioaktivitätszunahme läßt darauf schließen, daß neben der Bindung von BP-4,5-oxid an DNA, RNA und Protein die spontane und enzymatische Konjugation mit Glutathion den wesentlichen Anteil hat.

Diese Reaktion bewirkt allerdings keine merkliche Störung auf die Messung der EH-Aktivität etwa durch Substratverlust. Jedenfalls blieb die EH-Aktivität linear mit Zeit und Protein (Figur 5).

Die pH-Abhängigkeit der EH-Aktivität in Reuber-Hepatomzellhomogenaten gleicht den Befunden in menschlichen Lymphozyten (47).

In allen bislang untersuchten Zelllinien war die EH-Aktivität zu messen (Tabelle 5). Sie scheint im breiten Spektrum der Zelllinien ebenso ubiquitär vorhanden zu sein wie in den Organen des Versuchstieres (63). Allerdings waren die EH-Aktivitäten von Zellart zu Zellart recht verschieden. Selbst zwischen Fibroblastenkulturen von verschiedenen Probanden wurden deutliche Unterschiede gefunden. Diese Beobachtung und die hier entwickelten Methoden veranlaßten ausgedehnte Studien über einen möglichen Zusammenhang zwischen EH-Aktivität und

Tumorsuszeptibilität sowohl unter Verwendung von Lymphozyten (47) wie auch von Fibroblasten (53).

5.1.2. Messung der GSHT-Aktivität

5.1.2.1. Messung und Induktion der GSHT-Aktivität im Tierexperiment

Die Messung der GSHT-Aktivität im Leberzytosol von Versuchstieren unter Verwendung der von Glatt und Oesch (21) angegebenen Methode mit dem mutagenen Substrat (^3H)-BP-4,5-oxid ist technisch einfach, rasch durchführbar und sehr empfindlich. Bei Berücksichtigung der verschiedenen Blindwerte (3.6.4.2.) kann auf eine papierchromatographische Auftrennung, wie sie von Hayakawa et al. (64) der radiometrischen Produktbestimmung vorge-schaltet wurde, verzichtet werden. Die Reaktionsbedingungen liegen mit dem für die GSHT-Aktivität suboptimalen pH-Wert von 7,5 nahe bei den physiologischen Bedingungen, während van Cantfort et al. (65) das optimale, jedoch unphysiologische pH-Milieu von 10,0 zur Messung der GSHT-Aktivität wählten. Der augenfällige Nachteil der hier angewandten Methode ist der von Spezies zu Spezies unterschiedliche Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit mit Zeit und Protein. Somit ist die Angabe der spezifischen GSHT-Aktivität im Schafleberzytosol mit dem Substrat BP-4,5-oxid von Hayakawa et al. (64) in Frage zu stellen, da der angegebene Wert von 0,25 nmol/mg Protein/min bei einer Proteinmenge von 1 mg und 20 min Inkubationszeit möglicherweise erheblich von der initialen Reaktionsgeschwindigkeit abweicht. Auch van Cantfort et al. (65) gaben für ihre Methode eine Begrenzung der Zeit-linearität der GSHT-Aktivitätsmessung im Rattenleberzytosol auf 3 min an.

Als eine Ursache für die Verminderung des Substratumsatzes bei längerer Inkubationszeit und steigender Protein-

zugabe wurde die Hemmung der Reaktion durch das Produkt nachgewiesen (4.3.2.). Es wäre nun zu untersuchen, welches Spektrum der vier möglichen stereoisomeren BP-4,5-oxid-GSH-Konjugate durch die verschiedenen reinen GSH-S-Transferasen gebildet wird und wie sich diese Produkte hemmend auf die Reaktion der reinen Transferasen auswirken. Es wurden deutliche Unterschiede der chemischen Eigenschaften und Substratspezifitäten der GSH-S-Transferasen verschiedener Spezies aufgezeigt (49), die sich möglicherweise auch auf die Hemmbarkeit durch das Produkt erstrecken. Das stärkere Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit mit längerer Inkubationszeit gegenüber den Kontrollen wie nach BP-Induktion bei NMRI-Mäusen, Sprague-Dawley- und Fischer-Ratten gezeigt (Figuren 10, 11 und 12), könnte durch eine bevorzugte Vermehrung von gut hemmbaren GSHT-Formen erklärt werden. Wird hier nicht versucht die initiale Reaktionsgeschwindigkeit zu quantifizieren, die als relevante Größe anzunehmen ist, da in vivo kaum mit einer wesentlichen Kumulation des Produktes in der Zelle zu rechnen ist, können Induktionseffekt verwischt werden.

Die Untersuchung der Induzierbarkeit der mikrosomalen GSHT-Aktivität mit dem Substrat BP-4,5-oxid führte für Phenobarbital in der Leber von Balb/c-Mäusen und Sprague-Dawley-Ratten, durch den Linearitätsmangel der Reaktion bedingt, zu methodisch unsicheren, schwach positiven Effekten, während die zytosolische Aktivität statistisch signifikant induziert wurde. Bei Wiederholung des Versuches mit einer größeren Zahl Sprague-Dawley-Ratten in der Induktions- und Kontrollgruppe entsprach die mikrosomale GSHT-Aktivität mit dem Substrat DNCB der behandelten Tiere den Kontrollen. Der in der Literatur angegebene positive Effekt von MC auf die zytosolische Aktivität wurde bestätigt (66), während auch hier keine Induktion der mikrosomalen Aktivität gefunden wurde. Die Gleichartigkeit der Wirkung von MC und BNF auf die MO-Aktivität (15) ist in Bezug auf die GSHT-Aktivität nicht zu beobachten,

da BNF weder die mikrosomale noch die zytosolische GSHT-Aktivität beeinflusst.

Der aktive Metabolit BP-4,5-oxid wird durch die EH in Rattenlebermikrosomen bei hoher Affinität des Enzyms zum Substrat ($K_M = 6 \mu M$) mit großer maximaler Reaktionsgeschwindigkeit ($V_{max} = 7 \text{ nmol/mg mikrosomales Protein/min}$) umgesetzt (42), während die Bedeutung der Konkurrenzreaktion im gleichen Zellkompartiment durch die GSHT-Aktivität ($K_M \approx 20 \mu M$, $V_{max} = 1 \text{ nmol/mg mikrosomales Protein/min}$) (67) verhältnismäßig gering ist. Bei Epoxiden, die schlechte Substrate für die EH sind wie Transstilbenoxid oder die sogar Inhibitoren der EH sind wie Cyclohexenoxid oder 1,1,1-Trichlorpropenoxid dürfte gegenüber der EH die mikrosomale GSHT eine wichtige Rolle spielen. Falls solche Epoxide im endoplasmatischen Retikulum gebildet werden und wegen ihrer Lipophililität schlecht aus den Membranen ins Zytosol übergehen, könnte der mikrosomalen GSHT auch gegenüber der zytosolischen GSHT eine bedeutende Funktion zukommen.

5.1.2.2. Messung der GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen

Die Bestimmung der spezifischen GSHT-Aktivität ist wegen des deutlichen Abfalls der Reaktionsgeschwindigkeit mit längerer Inkubationszeit und mit höherer Proteinzugabe im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzellhomogenates ebenso problematisch wie im Leberzytosol mancher Tierspezies wie z.B. bei Rhesusaffen und Beagle-Hunden (Figur 8). Nachdem eine längere Vorinkubation bei $37^\circ C$ ohne BP-4,5-oxid keinen Aktivitätsverlust bewirkt (Figur 7), ist auch in diesem Fall eine Produkthemmung anzunehmen. Das stärkere Absinken des Substratumsatzes mit Zeit und Protein bei einer GSH-Konzentration von 0,5 mM gegenüber 5 mM (Figur 16, Tabelle 10) läßt auf eine Konkurrenz von GSH und BP-4,5-oxid-GSH-Konjugat schließen.

Die Messung der GSHT-Aktivität im 10 000 g-Überstand des Reuber-Hepatomzellhomogenates mit dem Substrat BP-4,5-oxid ist damit nicht geeignet, in Testreihen mit hoher Probenzahl auch verhältnismäßig kleine Induktionseffekte präzise zu erfassen. Diese Methode bietet lediglich die Möglichkeit, in Einzelfällen die Substratumsatzkurven von Homogenaten behandelter und nicht behandelter Zellen wie für die Tierexperimente gezeigt (Figuren 8 - 13) gegenüberzustellen, um gegebenenfalls auf diese Art und Weise Induktionen veranschaulichen zu können.

Die spektrophotometrische Messung der GSHT-Aktivität von Habig et al. (43) mit den Substraten 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol wurde von Smith et al. (68) zur Enzymbestimmung im 100 000 g-Überstand von Homogenaten verschiedener Zellkulturlinien eingesetzt. Die Übertragung auf den 10 000 g-Überstand von Reuber-Hepatomzellhomogenaten zeigte für DNCB eine ausreichende Empfindlichkeit bei Linearität der Reaktion mit Zeit und Protein (4.4.2., Figuren 18 und 19). Zur Bestimmung der GSHT-Aktivität in großen Testreihen ist der Proteineinsatz aus dem 10 000 g-Überstand des Zellhomogenates in die Inkubation vorteilhaft, weil nach Entfernung der großen Zellfragmente und -organellen (wie z.B. Membranbruchstücke, Kerne und Mitochondrien) eine rasch und einfach herstellbare Fraktion, die praktisch die gesamte GSHT-Aktivität der Zelle enthält, als Ausgangspräparation zur Messung der spezifischen Aktivität dient. Es bestehen gute Voraussetzungen gegebenenfalls Affinitätsänderungen der Substrate DNCB und GSH zu erfassen (Figuren 20 und 21). Wegen ihrer hohen Lagerstabilität (Figur 22) wurde die GSHT-Aktivität bei umfangreichen Versuchsreihen (4.6.) entweder nach ca. 12-stündiger Lagerung im Eisbad oder nach Einfrieren bei -20°C für 24 Stunden im Anschluß an die MO- und EH-Aktivitätsbestimmung gemessen.

Der Übertragbarkeit der mit DNCB und DCNB gemessenen Aktivitäten auf das Substrat BP-4,5-oxid ist jedoch beschränkt. Die relativ hohe Umsatzrate des BP-4,5-oxids durch die

Rattenlebertransferase E wird nämlich mit DCNB nicht und mit DNCB nur als sehr niedrige Aktivität gemessen (49 , 69). Die photometrische Bestimmung mit 1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)propan, das für die Transferase E eine besonders hohe Substratspezifität hat, ist nicht empfindlich genug, um zur Differenzierung der GSHT-Aktivität im 10 000 g-Überstand von Reuber-Hepatomzellhomogenaten verwendet werden zu können.

Mit dem Substrat DNCB war in der Mikrosomenfraktion von Reuber-Hepatomzellen GSHT-Aktivität meßbar (Tabelle 12). Das Verhältnis 1:70 von mikrosomaler zu zytosolischer Aktivität war jedoch geringer als bei Sprague-Dawley-Ratten und Balb/c-Mäusen mit 1:40 (Tabellen 8 und 9). Der große notwendige Materialaufwand zur Präparierung einer ausreichenden Menge mikrosomalen Proteins gestattete keine Untersuchung zur differentiellen Induktion der mikrosomalen und zytosolischen GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen.

5.1.3. Messung der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen

Der direkte photometrische Test zur O-Desalkylierung von 7-Äthoxycumarin in Modifizierung der Methode von Ullrich und Weber (44) erwies sich dank seiner hohen Empfindlichkeit und breiten Substratspezifität, die sich im Verhältnis zur Benzo(a)pyren-Hydroxylierung insbesondere in einer besseren Meßbarkeit der P-450-Formen zeigt (507, als sehr gut für die Bestimmung der MO-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen geeignet. Zur Differenzierung zwischen den einzelnen MO-Formen bietet sich der Einsatz diagnostischer Inhibitoren wie α -Naphthoflavon, Metyrapon und Tetrahydrofuran an (707) Im Kapitel 4.6.3. ist eine Anwendungsmöglichkeit beschrieben.

5.2. Beeinflußbarkeit der MO-, EH- und GSHT-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen durch Fremdsbstanzen

Das Wachstumsverhalten von Reuber-Hepatomzellen ist im Gegensatz zu Humanfibroblasten durch das Fehlen einer Kontaktinhibition gekennzeichnet. Daran gekoppelt ist ein stärkeres Absinken der MO- und ein etwas weniger starkes Absinken der EH-Aktivität in Reuber-Hepatomzellen bei zunehmender Zelldichte auf der Platte (Figur 26), während Humanfibroblasten im Zustand der Kontaktinhibition höhere Enzymaktivitäten als in der präkonfluenten Phase aufweisen. (53). Die Wachstumsabhängigkeit der GSHT-Aktivität in Reuberhepatomzellen ist nicht sehr ausgeprägt (Figur 27). Folglich mußte, um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Induktionsversuchen zu wahren, ein standardisierter Bereich aus der logarithmischen Wachstumskurve gewählt werden. Dennoch traten bedingt durch Stimulationseffekte mancher Fremdstoffsubstanzen in niedrigen Konzentrationen auf die Zellteilung (z.B. Benzo(a)-pyren) und bedingt durch Verlangsamung der Zellteilung bei Fremdstoffkonzentrationen, die noch nicht zu morphologischen Veränderungen oder gar zu Zelltod führten, Differenzen der Zelldichte bei der Ernte gegenüber Kontrollplatten von bis zu 20 % auf. Somit können allein aufgrund unterschiedlicher Zelldichte in Bezug auf die EH-Aktivität bereits Abweichungen von 10 % bis 20 % von den Kontrollen entstehen, die nicht als Induktionseffekte zu werten sind wie z.B. 25 µM 7-Methylbenzo(c)acridin (Tabelle 19). Dieses Phänomen ist für die Induktionsstudie der MO-Aktivität wegen der zumeist deutlich ausgeprägten Effekte nicht so kritisch zu sehen.

Neben Substanzen, die im Ganztier Cytochrom P-448 induzieren, wie 3-Methylcholanthren, Benzo(a)pyren, Dibenz(a,h)-anthracen und Aroclor 1254 zeigten auch Substanzen, die im Ganztier andere Cytochrom P-450-Formen induzieren, wie Phenobarbital, Pregnenolon-16α-carbonitril und Cyproteron-

acetat eine steigernde Wirkung auf die MO-Aktivität in Reuber-Hepatoma-Zellen. Owens und Nebert haben jedoch für diese Zelllinie Befunde erhoben, die darauf hindeuten, daß Phenobarbital im Gegensatz zum Tierexperiment eine P-448-Form der Monooxygenase induziert (34). Es ist damit zu rechnen, daß sich ebenfalls für die Induktionswirkung von Pregnenolon-16 α -carbonitril und Cyproteron-acetat nach der Untersuchung des Einflusses diagnostischer Inhibitoren und der CO-Differenzspektren keine Parallelen zu deren Induktionseigenschaften im Tierexperiment herstellen lassen. Das breite Plateau im suboptimalen Bereich der MO-Induktion in Abhängigkeit von der Konzentration des 2-Aminofluorens deutet darauf hin, daß entweder nur eine oder ein begrenztes Spektrum von MO-Formen induziert wird oder daß die Induktion abweichend von den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen über einen anderen weniger effektiven Mechanismus bewirkt wird. Theoretisch wäre auch möglich, daß 2-Aminofluoren die MO-Aktivität nicht durch eine Erhöhung der Neusynthese, sondern durch eine Verlängerung der Lebensdauer von Komponenten des MO-Komplexes verursacht.

Die tierexperimentellen EH-Induktoren Phenobarbital, 3-Methylcholanthren, Pregnenolon-16 α -carbonitril (71) und Transstilbenoxid (50) zeigten in Reuber-Hepatoma-Zellen keine positive Wirkung. In Primärkulturen von foetalen Rattenleberzellen wurde kurz vor Beendigung dieser Studie eine Induktion der EH-Aktivität durch Phenobarbital und Transstilbenoxid von Goujon et al. (37) nachgewiesen. Die Kulturen besitzen jedoch einen wechselnden Fibroblastenanteil und zeigen stetig abnehmende Kontrollaktivitäten der MO und EH, so daß Manipulationen der Enzymaktivitäten für Mutagenitäts- und Karzinogenitätsstudien in diesen Zellen nicht ausgenutzt werden können. Für keine der untersuchten Substanzen einschließlich der tierexperimentell positiv wirkenden Substanzen Phenobarbital und 3-Methylcholanthren wurde ein eindeutiger Induktionseffekt auf die GSHT-Aktivität mit den Substraten DNCB und DCNB

nachgewiesen (Tabellen 15, 16, 18, 20 und 21). Allerdings steht zur Zeit noch kein genügend empfindliches und spezifisches Verfahren zur Erfassung der Transferase E zur Verfügung, um das gesamte GSHT-Spektrum abzudecken, das mit dem Substrat BP-4,5-oxid gemessen wird (49). Der möglicherweise geringfügig positive Einfluß von Picen auf die GSHT-Aktivität mit dem Substrat DNCB (Tabelle 20) könnte dann vielleicht deutlicher herausgestellt werden.

Die positiven Wirkungen von ANF und BNF auf die EH-Aktivität erwiesen sich als Aktivierungen. In diesem Sinne ist auch die EH-Aktivitätssteigerung in menschlichen Lymphozyten zu deuten (72). ANF induziert die MO-Aktivität, hemmt jedoch hauptsächlich den Angriff der MO an den Positionen 7, 8, 9 und 10 des Benzo(a)pyrens und begünstigt den Umsatz des BP-4,5-oxids durch Aktivierung der EH. Hierin ist eine Parallele zur Auswirkung der TSO-Induktion in Sprague-Dawley-Ratten auf den Metabolismus des Benzo(a)pyrens zu sehen (50). Bislang wurde bei Untersuchungen zur Beeinflussung der Tumorsuszeptibilität durch ANF und BNF (56) in der Diskussion die EH-Aktivierung nicht berücksichtigt. Es scheint durchaus erfolgversprechend, die beiden stereoisomeren Benzoflavone zur Modulation von Stoffwechselwegen chemischer Karzinogene in Zellkultur einzusetzen, um das Verständnis der Bedeutung einzelner Metabolismusschritte für die Karzinogene und Mutagene in eukaryotischen Zellen zu vertiefen.

Beim Paarvergleich der karzinogenen und nicht karzinogenen Strukturisomere auf ihre Induktionspotenz der MO-, EH- und GSHT-Aktivität zeigten lediglich Benzo(a)pyren und Benzo(e)pyren einen qualitativen Unterschied in Bezug auf die MO-Aktivität. Benzo(e)pyren ist entweder kein oder ein so schwach wirksamer Induktor, daß Konzentrationen auf den Kulturplatten notwendig werden, die an die Zellen im Ganztier nicht herangebracht werden können. Die entsprechende Dosierung der Substanz Picen, die möglicherweise einen geringen Effekt auf die GSHT-Aktivität mit dem Sub-

strat DNCB zeigt, ist für Dibenz(a,h)anthracen wegen starker Toxizität nicht verwendbar. Die ausgeprägte Toxizität, Mutagenität und Karzinogenität von Dibenz(a,h)-anthracen gegenüber Picen dürfte eher auf die besondere Reaktivität der von dieser Substanz abgeleiteten Metabolite als auf die Modulation der für die Aktivierung oder Inaktivierung relevanten Enzyme zurückzuführen sein. Die niedrige Toxizität und die Befähigung zur Aktivierung der EH können für das Fehlen der Karzinogenität von 12-Methylbenzo(a)acridin gegenüber 7-Methylbenzo(c)acridin eine Teilursache darstellen. Diese Unterschiede sind jedoch relativ klein, so daß sie zur Erklärung des gewaltigen Unterschiedes in der Karzinogenität nicht allein ausreichen. Die fluorierten 7-Methyl-6H- [1] benzothiopyrano-[4,3-b]chinoline sind wesentlich schwächere MO-Induktoren als die Methylbenzoacridine und die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe. Untereinander zeigen sie eine nahezu gleiche Potenz als MO-Induktoren, und sie haben keinen Effekt auf die EH- und GSHT-Aktivitäten, so daß ihre unterschiedliche Karzinogenität und Mutagenität nicht auf verschiedene enzyminduzierende Wirkung zurückgeführt werden kann oder daß ein solcher Unterschied in diesem Zellkultursystem nicht erfaßt wird.

Ein Unterschied könnte auf den ersten Hinblick bei der EH und GSHT zwischen in vivo- und in vitro-Induktion vermutet werden, da diese Enzyme durch keine der untersuchten Substanzen induziert wurden, obwohl sie in der Leber verschiedener Tiere positive Effekte zeigten. Möglicherweise fehlen also in den Reuber-Hepatomzellen die entsprechenden Induktionsapparate. Dies gleicht der Situation in extrahepatischen Geweben, in denen ebenfalls bis jetzt keine EH- oder GSHT-Induktion nachgewiesen werden konnte, aber die dennoch die Zielorgane der untersuchten Kanzerogene darstellen.

In anderer Hinsicht wäre es allerdings wünschenswert, neben der MO auch die Folgemetabolismusenzye EH und GSHT im Zellkultursystem zu modulieren. Denn im Zellkultursystem

lassen sich leicht biologische Effekte quantitativ erfassen, die durch kanzerogene reaktive Metabolite hervorgerufen werden können, wie Mutation, Induktion von Schwesterchromatidaustausch, Reparatur-DNA-Synthese oder Bildung von Mikronuclei. Durch Modulation von Enzymaktivitäten lassen sich damit leicht die Metabolismusschritte, die entscheidend für Aktivierung oder Inaktivierung sind, herausstellen.

Deshalb wurde in dieser Studie intensiv danach gesucht, EH- und GSHT-Induktoren zu finden. Dies ist nicht gelungen, möglicherweise weil die prinzipiellen Mechanismen für diese Systeme fehlen. Bei der GSHT bietet sich glücklicherweise noch der Ausweg, über Veränderung der GSH-Konzentration in den Zellen die GSHT-Aktivität zu modulieren. Für die EH sind in dieser Studie keine Induktoren, dagegen aber Aktivatoren gefunden worden. Am potentesten waren α - und β -Naphthoflavon. Die Aktivierung der EH durch α -Naphthoflavon wirft die Frage auf, inwieweit die Unterdrückung verschiedener biologischer Effekte durch diese Substanz wirklich auf eine Inhibition der Monooxygenase (56, 57, 73), einer bekannten Wirkung von α -Naphthoflavon, zurückzuführen ist und ob dabei die Veränderung der EH-Aktivität nicht eine wichtige Rolle gespielt hat. Wie aus dem deutlichen Potenzunterschied der beiden Naphthoflavone als MO-Inhibitoren bei sehr ähnlicher EH-aktivierender Potenz hervorgeht, sind diese beiden Effekte nicht miteinander gekoppelt. Die unterschiedlichen Wirkungen von α - und β -Naphthoflavon und von möglicherweise noch weiteren Substanzen lassen sich dementsprechend differentiell zur Manipulation von Enzymaktivitäten in Zellsystemen ausnutzen.

Die Kenntnis der Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme in Zellkulturen, die zur Erfassung von mutagenen und karzinogenen Eigenschaften von Testsubstanzen verwendet werden, ist von großer Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse. Durch Modulation dieser Enzyme, etwa durch Inhibition, Aktivierung oder Induktion, können die entscheidenden aktivierenden und inaktivierenden Stoffwechselleistungen erkannt werden und die Übertragbarkeit der Testergebnisse auf andere Systeme verbessert werden.

Mit Ausnahme von Studien über das Monooxygenase(MO)-System wurden bis jetzt sehr wenige Untersuchungen von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen und deren Regulation in Zellkulturen durchgeführt. In dieser Studie wurden deshalb Meßmethoden solcher Enzyme auf die besonderen Verhältnisse von kultivierten Zellen angepaßt und verifiziert. Danach wurde versucht, die Aktivitäten zu modulieren. Untersucht wurde die O-Desalkylierung von 7-Äthoxycumarin als MO-Aktivität, die Hydratisierung von Benzo(a)pyren-4,5-oxid (BP-4,5-oxid) zu 4,5-Dihydroxy-4,5-dihydrobenzo(a)pyren als Epoxidhydratase (EH)-Aktivität und die Konjugation von Glutathion mit BP-4,5-oxid, 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB) und 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (DNCB) als Glutathion-S-Transferase (GSHT)-Aktivitäten.

Vor dem Versuch mit Zellkulturen wurden Messungen an Geweben des Ganztieres durchgeführt. Obwohl die GSHT-Aktivitätsmessung mit dem Substrat BP-4,5-oxid im Leberzytosol erschwert war wegen des schnellen Abweichens der Zeit-Umsatz- und Protein-Umsatzkurven von einem linearen Verlauf, was auf eine Produkthemmung zurückgeführt werden konnte, ließ sich nach Behandlung mit Phenobarbital in allen untersuchten Tierspezies eine Steigerung der spezifischen initialen Reaktionsgeschwindigkeit nachweisen. Bemerkenswerterweise ist die Induktion der zytosolischen GSHT nicht von einer Induktion der bisher weniger bekannten mikrosomalen Form dieses Enzyms begleitet. Dieser

Befund ist ein wesentliches Indiz, daß die mikrosomale GSHT-Aktivität keine unspezifische Verunreinigung der mikrosomalen Fraktion mit zytosolischer GSHT darstellt.

Zur Messung der EH in Reuber-Hepatomzellen wurde das radiometrische Meßverfahren mit dem Substrat BP-4,5-oxid für diesen Zweck adaptiert. Wichtig für die Reproduzierbarkeit der Messung bei Parallelinkubationen war eine Modifikation und strikte Standardisierung der Homogenisation des Zellmaterials. Neben der Untersuchung des linearen Bereichs und des pH-Optimums des Reaktionsverlaufs wurde das Verfahren durch Identifikation des Produktes und durch Erfassung von Nebenprodukten verifiziert. Für die GSHT-Messung erwies sich das Substrat BP-4,5-oxid in Reuber-Hepatomzellen als sehr ungünstig wegen des wesentlich stärkeren Abweichens der Reaktion von einem linearen Verlauf als bei Rattenleberpräparationen. Dagegen konnten Meßverfahren mit DCNB und DNCB als Substrate ohne wesentliche Änderungen übernommen werden. Wegen des erheblichen Aktivitätsverlustes durch Homogenisierung wurde die MO-Aktivität mit 7-Äthoxycumarin in ganzen Reuber-Hepatomzellen gemessen. Diese Messung in ungebrochenen Zellen erwies sich für die MO-Aktivität als gut reproduzierbar, was für die Messung der EH- und GSHT-Aktivität nicht zutraf, aber auch nicht erforderlich war. Da die Wachstumsbedingungen alle Enzymaktivitäten zum Teil erheblich beeinflussten, wurden standardisierte Bedingungen gewählt, um Fremdstoffwirkungen auf die Enzyme zu untersuchen.

Mit dem Ziel, die verschiedenen Enzymaktivitäten in Zellkulturen zu modulieren, wurde ausgehend von Substanzen, die im Tierexperiment Induktionseffekte zeigten, eine breite Palette von Verbindungen getestet. Außer Benzo(e)-pyren induzierten alle polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, β -Naphthoflavin und Aroclor 1254 schon bei niedrigsten Konzentrationen die MO-Aktivität stark. Bei höheren Dosierungen erreichte die Dosis-Induktionskurve für alle diese Verbindungen ein ähnliches Plateau von

einer etwa 30-fachen Induktion. Mit Benzo(e)pyren, α -Naphthoflavin und einigen heteropolycyclischen Substanzen wurde die gleiche Induktion bei 50- bis 1000-fach höheren Dosierungen erreicht. 2-Aminofluoren erwies sich bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen als Induktor der MO-Aktivität, die maximal auf das 4,5-fache der Kontrollen anstieg, dann über einen Konzentrationsbereich von zwei Zehnerpotenzen gleich blieb. Dies läßt auf einen abweichenden Induktionsmechanismus im Vergleich zu den polycyclischen Kohlenwasserstoffen schließen. Phenobarbital, Pregnenolon-16 α -carbonitril und Cyproteronacetat induzierten bei hohen Dosierungen die MO-Aktivität schwach, während Transstilbenoxid und Quercetin inaktiv waren.

Die im Tierexperiment in der Leber wirksamen EH- und / oder GSHT-Induktoren wie Phenobarbital, 3-Methylcholanthren, Pregnenolon-16 α -carbonitril, Aroclor 1254 und Transstilbenoxid zeigten in Reuber-Hepatoma-Zellen keine Induktion dieser Enzymaktivitäten. Dies entspricht dem Verhalten dieser Substanzen in extrahepatischen Geweben, wo bisher ebenfalls keine Induktion gefunden wurde. Auch alle anderen untersuchten Substanzen bewirkten keine Induktion der EH oder GSHT in den Reuber-Hepatoma-Zellen. Interessanterweise erwies sich α - und β -Naphthoflavin bereits bei niedriger Konzentration und 12-Methylbenzo(a)acridin bei höherer Konzentration als Aktivator der EH-Aktivität. Die Höhe dieses Aktivierungseffektes durch α - und β -Naphthoflavin mit dem Faktor 2 gegenüber den Kontrollen erreichte jedoch die Induktionswirkung der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe in Bezug auf die MO-Aktivität bei weitem nicht. Aufgrund der bekannten und hier bestätigten wesentlich stärkeren Inhibition der MO-Aktivität durch α - als durch β -Naphthoflavin bietet sich eine Möglichkeit, durch Aktivierung der EH-Aktivität mit gleichzeitig starker oder marginaler Hemmung der MO-Aktivität die relative Bedeutung dieser Metabolismusschritte für die karzinogene Wirkung einer Testsubstanz im Zellkultursystem abzuschätzen.

Viele homo- und heteropolyzyklische Substanzen werden vorzugsweise durch metabolisierende Systeme, die mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen induziert sind, zu Mutagenen aktiviert. Die Beobachtung, daß einige polyzyklische Verbindungen trotz hoher bakterieller Mutagenität nicht oder nur schwach karzinogen sind, während Strukturisomere stark karzinogen wirken, könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, daß die hochkarzinogenen Stoffe im Gegensatz zu den wenig aktiven ihre eigene Aktivierung induzieren. Diese Hypothese wurde mit dem Zellkultursystem für einige Beispiele untersucht. Dabei hob sich das schwach karzinogene Benzo(e)pyren dadurch vom starken Karzinogen Benzo(a)pyren ab, daß es nicht oder nur bei sehr hohen Konzentrationen, bei denen die Substanz im Kulturmedium ausfällt, die MO-Aktivität induziert. Das Karzinogen Dibenz(a,h)anthracen unterschied sich vom Nicht-Karzinogen Picen durch eine wesentlich stärkere Toxizität, so daß ein möglicher gering positiver Effekt auf die GSHT-Aktivität bei einer hohen Picen-Konzentration mit Dibenz(a,h)anthracen nicht nachvollzogen werden konnte. Zwar wurde für das Nicht-Karzinogen 12-Methylbenzo(a)acridin eine niedrigere Toxizität und eine Aktivierung der EH um ca. 40 % gefunden, jedoch können diese quantitativ geringen Abweichungen gegenüber dem hochkarzinogenen 7-Methylbenzo(c)acridin nicht allein das Fehlen von Karzinogenität erklären. Die Wirkungen der an Positionen 2, 3 und 4 fluorierten 7-Methyl-6H-[1]benzothiopyrano-[4,3-b]chinoline auf die Fremdstoffmetabolismuseenzyme ist untereinander so gleichartig, daß die Differenz der mutagenen und karzinogenen Potenzen hierin nicht ihre Ursache haben können. Die vorgeschlagene Hypothese scheint in einzelnen Fällen ganz oder teilweise zuzutreffen, kann aber nicht generell die Diskrepanz zwischen karzinogenen und nicht karzinogenen Mutagenen erklären.

Nach der Adaption von Meßverfahren für fremdstoffmetabolisierende Enzyme für kultivierte Zellen wurde in den Zellkulturexperimenten gezeigt, daß sich die MO-Aktivität in diesem System gut modulieren läßt und daß induzierende

Wirkungen von Substanzen auf das MO-System mit großer Sensitivität erfaßt werden können. Induktion der EH- und GSHT-Aktivität wurde analog zu extrahepatischen Geweben und im Gegensatz zur Leber in vivo nicht gefunden. Dagegen wurde durch die Entdeckung der EH-aktivierenden Wirkung von Benzoflavonen eine andere Möglichkeit gefunden, die Aktivität dieses Enzyms zu modulieren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Statistisches Jahrbuch 1978 für die Bundesrepublik Deutschland, Herausgeber: Statistisches Bundesamt. Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart und Mainz 1979
2. Eder, M., Gedigk, P.: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1974
3. Higginson, J., Muir, C.S.: Epidemiology. In: Cancer Medicine, edited by J.F. Holland and E. Frei. III, pp. 241 - 306. Lea & Febiger, Philadelphia 1973
4. Redmond, D.E., Jr. Tobacco and Cancer: The First Clinical Report, 1761. New England J. Med., 282: 18 - 23, 1970
5. Pott, P.: Chirurgical Observations Relative to the Cancer of the Scrotum. London, 1775. Reprinted in Natl. Cancer Inst. Monograph, 10: 7 - 13, 1961
6. Rehn, L.: Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. Arch. Klin. Chir., 50: 588 - 600, 1895
7. Yamagiwa, K., Ichikawa, K.: Experimentelle Studien über die Pathogenese der Epithelialgeschwülste (II. Mitteilung). Mitteil. Med. Fakultät Kaiserl. Univ. Tokyo, 17, (I), 1917
8. Kennaway, E.L., Hieger, I.: Carcinogenetic Substances and their Fluorescence Spectra. Brit. Med. J., 1: 1044 - 1046, 1930
9. Cook, J.W., Hewett, C.L., Hieger, I.: The Isolation of a Cancer-Producing Hydrocarbon from Coal Tar. Parts I, II and III. J. Chem. Soc., 395 - 405, 1933
10. Miller, C.E.: Some Current Perspectives on Chemical Carcinogenesis in Humans and Experimental Animals: Presidential Address. Cancer Res. 38, 1479 - 1496, 1978
11. Grover, P.L., Sims, P.: Enzyme-Catalyzed Reactions of Polycyclic Hydrocarbons with Deoxyribonucleic Acid and Proteins in Vitro. Biochem. J., 110, 159 - 160, 1968
12. Gelboin, H.V.: Microsome-Dependent Binding of Benzo(a)-pyrene to DNA. Canc. Res., 29, 1272 - 1276, 1969

13. Rapoport, S.M.: Medizinische Biochemie. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1977
14. Conney, A.H.: Pharmacologic Implications of Microsomal Enzyme Induction. Pharmacol. Rev. 19, 317 - 366, 1967
15. Haugen, D.A., Coon, M.J.: Induction of Multiple Forms of Mouse Liver Cytochrom P-450. J. Biol. Chem. 251, 1817 - 1827, 1976
16. Holger, G., Yagi, H., Dansette, P., Jerina, D.M., Levin, W., Lu, A.Y.H., Conney, A.H.: Effects of Inducers and Epoxide Hydrase on the Metabolism of Benzo(a)pyrene by Liver Microsomes and a Reconstituted System: Analysis by High Pressure Liquid Chromatography. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4356 - 4360, 1974
17. Sims, P., Grover, P.L.: Epoxides in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism and Carcinogenesis. Advanc. Cancer Res. 20, 165 - 274, 1974
18. Oesch, F.: Review Article: Mammalian Epoxide Hydrases: Inducible Enzymes Catalysing the Inactivation of Carcinogenic and Cytotoxic Metabolites Derived from Aromatic and Olefinic Compounds. Xenobiotica 3, 305 - 340, 1973
19. Bentley, P., Oesch, F.: Purification of Rat Liver Epoxide Hydratase to Apparant Homogeneity. FEBS Letters 59, 291 - 295, 1975
20. Oesch, F.: Epoxide Hydratase. In: Progress in Drug Metabolism, Vol. 3, 243 - 301. Herausgegeben von: Bridges, J.W., Chasseaud, L.F. England 1979
21. Glatt, H.R., Oesch, F.: Inactivation of Electrophilic Metabolites by Glutathione S-Transferases and Limitation of the System Due to Subcellular Localization. Arch. Toxicol. 39, 87 - 96, 1977
22. Friedberg, T., Bentley, P., Stasiecki, P., Glatt, H.R., Raphael, D., Oesch, F.: The Identification, Solubilization, and Characterization of Microsomeassociated Glutathione S-Transferases. J. Biol. Chem. 254, 12028 - 12033, 1979
23. Bentley, P., Oesch, F.: Enzymes Involved in Activation and Inactivation of Carcinogens and Mutagens. In:

- Primary Liver Tumors, Falk Symposium 25. Herausgegeben von: Remmer, H., Bannasch, P., Bolt, H.M., Popper, H. MTP Press Limited, 1977
24. Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D.: Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2281 - 2285, 1973
 25. Oesch, F., Bentley, P., Glatt, H.R.: Prevention of Benzo(a)pyrene-Induced Mutagenicity by Homogeneous Epoxide Hydratase. Int. J. Cancer 18, 448 - 452, 1976
 26. Bentley, P., Oesch, F., Glatt, H.R.: Dual Role of Epoxide Hydratase in Both Activation and Inactivation of Benzo(a)pyrene. Arch. Toxicol. 39, 65 - 75, 1977
 27. Rannug, U., Sundvall, A., Ramel, C.: The Mutagenic Effect of 1,2-Dichloroethane on Salmonella Typhimurium I. Activation Through Conjugation with Glutathione in Vitro. Chem. Biol. Interactions 20, 1 - 16, 1978
 28. Bonney, R.J., Maley, F.: Some Characteristics and Functions of Adult Rat Liver Parenchymal Cells in Primary Culture. In: Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver. Herausgegeben von Gerschenson, L.E., Thompson, E.B., Academic Press, New York 24 - 45, 1975
 29. Bissell, D.M., Guzelian, P.S.: Microsomal Functions and Phenotypic Change in Adult Rat Hepatocytes in Primary Monolayer Culture. In: Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver. Herausgegeben von: Gerschenson, L.E., Thompson, E.B., Academic Press, New York 119 - 136, 1975
 30. Tashjian, A.H., Richardson, U.I., Strunk, R., Ofner, P.: Differentiated Functions in Clonal Strains of Hepatoma Cells. In: Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver. Herausgegeben von: Gerschenson, L.E., Thompson, E.B., Academic Press, New York 168 - 180, 1975
 31. Borenfreund, E., Higgins, P.J., Steinfass, M., Bendich, A.: Properties and Malignant Transformation of Established Rat Liver Parenchymal Cells in Culture. J. Natl. Cancer Inst. 55, No. 2, 375 - 384, 1975

32. Scott, W.A., Tomkins, G.M.: The Use of Inhibitors in the Study of Hormone Mechanisms in Cell Culture. In: Methods in Enzymology, Vol. 40, Hormone Action, Part E, Herausgegeben von: Malley, B.W., Hardman, J.G., 273 - 293, Academic Press New York, 1975
33. Nebert, D.W., Gelboin, H.V.: Substrat-Inducible Microsomal Aryl Hydroxylase in Mammalian Cell Culture. J. Biol. Chem. 243, 6242 - 6249, 1968
34. Owens, I.S., Nebert, D.W.: Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Induction in Mammalian Liver-Derived Cell Cultures. Molecular Pharmacology 11, 94 - 104, 1974
35. Wiebel, F.J., Gelboin, H.V.: Enzyme Induction and Polycyclic Hydrocarbon Metabolism in Cell Culture, Experimental Animals and Man. In: Chemical Carcinogenesis Essays. Herausgegeben von: Montesano, R., Tomatis, L., Iarc Scientific Publications No. 10, 57 - 81, 1973
36. Bittner, M.A., Ruddon, R.W.: Induction and Decay of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity in Mouse 3T3 Cells. Molecular Pharmacology 12, 966 - 976, 1976
37. Goujon, F.M., Van Cantfort, J., Gielen, J.E.: Comparison of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase and Epoxide Hydratase. Induction in Primary Fetal Rat Liver Cell Culture. Chem. Biol. Interactions 31, 1980
38. Berwald, Y., Sachs, L.: In Vitro Cell Transformation with Chemical Carcinogens. Nature 200, 1182 - 1184, 1963
39. Marquardt, H. Kuroki, T., Huberman, E., Selkirk, J.K., Heidelberger, C., Grover, P.L., Sims, P.: Malignant Transformation of Cells Derived from Mouse Prostate by Epoxides and Other Derivatives of Polycyclic Hydrocarbons. Cancer Res. 32, 716 - 720, 1972
40. Kouri, R.E.: Relationship Between Levels of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activity and Susceptibility to 3-Methylcholanthrene and Benzo(a)pyrene-Induced Cancers in Inbred Strains of Mice. Carcinogenesis 1, 139 - 151, 1976
41. Williams, G.M.: The Study of Chemical Carcinogenesis Using Cultured Rat Liver Cells. In: Gene Expression

- and Carcinogenesis in Cultured Liver. Herausgegeben von: Gerschenson, L.E., Thompson, E.B., Academic Press New York, 480 - 487, 1975
42. Schmassmann, H.U., Glatt, H.R., Oesch, F.: A Rapid Assay for Epoxide Hydratase Activity with Benzo(a)-pyrene 4,5-(K-region-)oxide as Substrate. *Anal. Biochem.* 74, 94 - 104, 1976
43. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B.: Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130 - 7139, 1974
44. Ullrich, V., Weber, P.: The O-Dealkylation of 7-Ethoxycoumarin by Liver Microsomes. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1171 - 1177, 1972
45. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275, 1951
46. McCaustland, D.J., Fischer, D.L., Kolwyck, K.C. et al.: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Derivatives: Synthesis and Physicochemical Characterization. In: *Carcinogenesis*, Vol. 1. Herausgegeben von: Freudenthal, R.I., Jones, P.W. Raven Press, New York, 1976
47. Kaltenbach, E.: Epoxidhydratase in menschlichen Lymphozyten und Lymphoblasten. Messverfahren, Grundaktivität, Induzierbarkeit, interindividuelle Unterschiede. Inauguraldissertation der Medizin. Mainz 1979
48. Booth, J., Keysell, G.R., Pal, K., Sims, P.: The Metabolism of Polycyclic Hydrocarbons by Cultured Human Lymphocytes. *FEBS Letters* 43, 341 - 344, 1974
49. Jakoby, W.B., Habig, W.H., Keen, J.M., Ketley, J.N., Pabst, M.J.: Glutathione S-Transferases: Catalytic Aspects. In: *Glutathione: Metabolism and Function*, Raven Press, New York, 189 - 211, 1976
50. Bückler, M., Golan, M., Schmassmann, H.U., Glatt, H.R., Stasiecki, P., Oesch, F.: The Epoxide Hydratase Inducer Trans-Stilbene Oxide Shifts the Metabolic Epoxidation of Benzo(a)pyrene from the Bay- to the K-Region and Reduces Its Mutagenicity. *Molecular Pharmacology* 16, 656 - 666, 1979

51. Scharf, R., Ullrich, V.: In Vitro Induction by Phenobarbital of Drug Monooxygenase Activity in Mouse Isolated Small Intestine. *Biochemical Pharmacology* 23, 2127 - 2137, 1974
52. Atlas, S.A., Vesell, E.S., Nebert, D.W.: Genetic Control of Interindividual Variations in the Inducibility of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase in Cultured Human Lymphocytes. *Cancer Res.* 36, 4619 - 4630, 1976
53. Tegtmeier, F.: Interindividueller Vergleich der Epoxidhydratase- und Glutathion-S-Transferase-Aktivität in kultivierten menschlichen Hautfibroblasten. Inauguraldissertation der Medizin, Mainz 1979
54. Alvares, A.P., Bickers, D.R., Kappas, A.: Polychlorinated Biphenyls: A New Type of Inducer of Cytochrome P-448 in the Liver. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70, 1321 - 1325, USA 1973
55. Schmassmann, H.U., Oesch, F.: Trans-Stilbene Oxide: A Selective Inducer of Rat Liver Epoxide Hydratase. *Molecular Pharmacology* 14, 834 - 847, 1978
56. Slaga, T.J., Berry, D.L., Juchau, M.R. et al. : Effects of Benzoflavones and Trichloropropene Oxide on Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Metabolism and Initiation of Skin Tumors. In: *Carcinogenesis*, Vol. 1. Herausgegeben von: Freudenthal, R.I., Jones, P. W. Raven Press, New York, 1976
57. Gelboin, H.V., Wiebel, F.J., Diamond, L.: Dimethylbenzanthracene Tumorigenesis and Aryl Hydrocarbon Hydroxylase in Mouse Skin. Inhibition by 7,8-Benzoflavone. *Science* 170, 169 - 171, 1970
58. Scribner, D.J.: Tumor Initiation by Apparently Non-carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 50, 1717 - 1719, 1973
59. Survey of Compounds Which Have Been Tested for Carcinogenic Activity. *Publ. Health Service Publication No. 149.* Washington, D.C. (Bände bis 1973)
60. Glatt, H.R., Schwind, H. Zajdela, F., Croisy, A. et al.: Mutagenicity of 43 Structurally Related Heterocyclic

- Compounds and Its Relationship to Their Carcinogenicity. Mutation Research 66, 307 - 328, 1979
61. Schwind, H.L.: Mutagenität einer homogenen Serie von heteropolyzyklischen aromatischen Verbindungen und Korrelation zu Kanzerogenitätsdaten. Inauguraldisertation der Medizin. Mainz 1979
 62. Arcos, J. C., Conney, A.H., Buu-Hoi, N.P.: Induction of Microsomal Enzyme Synthesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of Different Molecular Sizes. J. Biol. Chem. 236, 1291 - 1296, 1961
 63. Oesch, F., Glatt, H.R., Schmassmann, H.U.: The Apparent Ubiquity of Epoxide Hydratase in Rat Organs. Biochemical Pharmacology 26, 603 - 607, 1977
 64. Hayakawa, T., Udenfriend, S., Yagi, H., Jerina, D.: Substrates and Inhibitors of Hepatic Glutathione S-Epoxide Transferase. Archives of Biochemistry and Biophysics 170, 438 - 451, 1975
 65. Van Cantfort, J., Manil, L., Gielen, J.E. et al.: A New Assay for Glutathione S-Transferase Using (^3H)-Benzo(a)-pyrene 4,5-Oxide as Substrate. Biochem. Pharmacol. 28, 455 - 460, 1979
 66. Mukhtar, H., Bresnick, E.: Effects of Phenobarbital and 3-Methylcholanthrene Administration on Glutathione S-Epoxide Transferase Activity in Rat Liver. Biochem. Pharmacol. 25, 1081 - 1084, 1976
 67. Glatt, H.R.: Die Bedeutung verschiedener aktivierender und inaktivierender Stoffwechselschritte für die Mutagenität des Karzinogens Benzo(a)pyren. Gekürzte Fassung der Inauguraldisertation der Philosophie. Basel 1976
 68. Smith, G.J., Huebner, K., Litwack, G.: Expression of Ligandin and Glutathione S-Transferase Activities by Cells in Tissue Culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 1174 - 1180, 1977
 69. Nemoto, N., Gelboin, H.V., Habig, W.H. et al.: K-Region Benzo(a)pyrene 4,5-Oxide is Conjugated by Homogeneous Glutathione S-Transferases. Nature 255, 512, 1975

70. Ullrich, V., Weber, P., Wollenberg, P.: Tetrahydro-
furane - An Inhibitor for Ethanol-Induced Liver Micro-
somal Cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
64, 808 - 813, 1975
71. Oesch, F.: Differential Control of Rat Microsomal
"Aryl Hydrocarbon" Monooxygenase and Epoxide Hydratase.
J. Biol. Chem. 251, 79 - 87, 1976
72. Glatt, H.R., Kaltenbach, E., Oesch, F.: Epoxide Hydro-
lase Activity in Native and in Mitogen-Stimulated
Lymphocytes of Various Human Donors. *Cancer Res.* 40,
2552 - 2556, 1980
73. Schürer, C.C., Bartram, C.R., Glatt, H.R. et al.:
Benzo(a)pyrene 4,5-Oxide. Discrepancy Between Induction
of Sister Chromatid Exchange and Binding to DNA in
Cultured Human Fibroblasts. *Biochimica et Biophysica*
Acta 609, 272 - 277, 1980

8. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. F. Oesch gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die großzügige Gestaltung des materiellen Rahmens und die wissenschaftliche Betreuung sowie Herrn Dr. H.R. Glatt für seine enge Zusammenarbeit und intensiven Diskussionen.

Aus dem kollegialen Mitarbeiterkreis der Abteilung Molekularpharmakologie sind wegen ihrer besonders freundlichen Hilfsbereitschaft namentlich die Herrn Dr. P. Bentley, Dr. F. Tegtmeyer und Dr. K. Platt hervorzuheben.

Meiner Frau Simone habe ich für ihre verständige Geduld während der praktischen Arbeiten und ihre Hilfe bei der graphischen Ausgestaltung der Dissertation zu danken.

9.

LEBENS LAUF

Am 27.11.1953 wurde ich, Dirk Hans Raphael, als Sohn des Straßenbahnfahrers Hans Raphael und der Verkäuferin Ingrid Raphael (geb. Forchel) in Dortmund geboren. Von 1960 - 1964 besuchte ich in Dortmund-Marten die konfessionelle Gemeinschaftsgrundschule. Im Mai 1972 schloß ich mit dem Abitur den Besuch des neusprachlichen Zweiges der Lessing-Schule in Bochum-Langendreer ab.

Nach einem Semester Studium der Pharmazie in Münster nahm ich im April 1973 das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz auf. Die im Studiengang geforderten Prüfungen legte ich wie folgt ab: Ärztliche Vorprüfung 1974, 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1975, 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1978 und 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im April 1979 nach dem Praktischen Jahr an den Städtischen Krankenanstalten Wiesbaden (Wahlfach: HNO).

Am 28.11.1977 heiratete ich die medizinisch-technische Assistentin Simone Schweizer.

An der vorliegenden Dissertation arbeitete ich in der Abteilung für Molekularpharmakologie der Universität Mainz unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Oesch von 1976 bis 1980.

Seit Mai 1979 bin ich als Sanitätsoffizier der Bundeswehr tätig.

